

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Adam Čepa

STANOVENÍ OXIDAČNÍCH PRODUKTŮ BILIRUBINU

Determination of bilirubin oxidation products

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.

Supervizor: Prof. MUDr. Libor Vitek, Ph.D., MBA

Konzultant: Mgr. Jana Vaníková

Praha 2013

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a za podpory grantového projektu uděleného Grantovou agenturou Univerzity Karlovy č. 556912.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Seznam zkratek:

ACN	acetonitril
Ag	agonista
AhR	receptory aryl-hydrokarbonové dráhy (aryl-hydrocarbon receptors)
AM	aktomyozin
Bf	bilirubin free (volný bilirubin)
BOM	oxidační metabolity bilirubinu (bilirubin oxidation metabolites)
BOX	oxidační produkty bilirubinu (bilirubin oxidation products)
BLVRA	biliverdinreduktáza
CaCaMK	kalcium/kalmodulin-kináza
CAD	kalmodesmon
CaM	kalmodulin
cGMP	cyklický guanylát monofosfát (cyclic guanylate monophosphate)
CNS	centrální nervový systém
CPI-17	MLCP inhibiční protein
CSFv	mozkomíšní mok
DAD	detektor diodového pole
DAG	diacylglycerol
DM	diabetes mellitus
DMSO	dimethylsulfoxid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FABP	protein vázající mastné kyseliny
FBS	hovězí sérum (foetal bovine serum)
F _p	flavoprotein
GR	glutationreduktáza
GSH	glutation
HMOX	hemoxygenáza
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie (high pressure liquid chromatography)
IP3	inositol-3-fosfát

LDL	lipoprotein o nízké denzitě (low density lipoprotein)
M	myosin
MAPK	mitogenem aktivovaná protein-kináza
MET	mikrosomální elektronový transportní systém
MF	mobilní fáze
MLCK	lehký řetězec myozinu
MLCP	lehký řetězec myozin fosfatázy
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectometry)
MTT	thiazolyl blue tetrazolium bromide
MVM	4-methyl-3-vinyl-maleimid
NMR	nukleární magnetická rezonance
NOS	syntetáza oxidu dusnatého
PA	kyselina fosfatidová
PC	fosfatidylcholin
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PDGF	destičkový růstový faktor B
PIP 2	fosfatidylinositol-2-fosfát
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolipáza C
PLD	fosfolipáza D
R	receptor
Rho A	faktor Rho A
ROK	Rho kináza
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
SAH	subarachnoidální krvácení (subarachnoid hemorrhage)
SF	stacionární fáze
SR	sarkoplazmatické retikulum
UCB	nekonjugovaný bilirubin (unconjugate bilirubin)
UGT1A1	bilirubin UDP-glukoronosyltransferáza 1 A1
XOD	xantinoxidáza

Seznam symbolů:

F_m	průtok mobilní fáze
λ	vlnová délka
A	absorbance
T	teplota
t	čas
V	napětí řízených kalciových kanálů

ABSTRAKT (ČESKÁ VERZE)

Předkládaná diplomová práce se týká protektivních a antioxidačních vlastností žlučového pigmentu bilirubinu. Bilirubin je potentním scavengerem volných radikálů a reaktivních forem kyslíku, vznikajících v důsledku oxidačního stresu. Mírně zvýšené hladiny bilirubinu v cirkulaci jsou skutečně asociovány s nižším výskytem nemocí způsobených oxidačním stresem, jako jsou kardiovaskulární choroby, ateroskleróza, diabetes, či některá nádorová onemocnění. Cílem diplomové práce bylo zavedení metod přípravy a stanovení oxidačních produktů bilirubinu vznikajících za podmínek zvýšeného oxidačního stresu, a dále studium jejich fyzikálně-chemických vlastností a biologických účinků.

KLÍČOVÁ SLOVA (ČESKÁ VERZE)

Oxidační produkty bilirubinu

Bilirubin

Oxidační stres

Kapalinová chromatografie

Hmotnostní spektrometrie

ABSTRACT (ENGLISH VERSION)

This thesis is focused on protective and antioxidant properties of bile pigment bilirubin. Bilirubin is a potent scavenger of free radicals and reactive oxygen species generated by increased oxidative stress. Mildly elevated systemic levels of bilirubin are actually associated with lower incidence of oxidative stress-mediated diseases, such as cardiovascular disease, atherosclerosis, diabetes and certain types of cancer. The main aim of this thesis was to prepare bilirubin oxidation products *in vitro*, characterize their physical-chemical properties and then determine biological impact.

KEYWORDS (ENGLISH VERSION)

Bilirubin oxidation products

Bilirubin

Oxidative stress

Liquid chromatography

Mass spectrometry

OBSAH

1.	LITERÁRNÍ ÚVOD	11
1.1.	Oxidační stres	11
1.2.	Reaktivní formy kyslíku	11
1.3.	Reaktivní formy dusíku	14
1.4.	Antioxidační systém	14
1.5.	Katabolická dráha hemu	16
1.5.1.	Hemoxygenáza	18
1.5.2.	Oxid uhelnatý	19
1.5.3.	Biliverdinreduktáza	20
1.5.4.	Bilirubin	22
1.6.	Biomarkery oxidačního stresu	25
1.6.1.	Oxidační produkty bilirubinu	26
1.7.	Onemocnění spojená s oxidačním stresem	30
1.7.1.	Kardiovaskulární onemocnění	30
1.7.1.1.	Hypertenze	30
1.7.1.2.	Subarachnoidální krvácení	30
1.7.1.3.	Ateroskleróza	32
1.7.2.	Nádorová onemocnění	32
1.7.3.	Metabolická onemocnění	33
1.7.3.1.	Diabetes mellitus	33
1.7.4.	Alergická/imunologická onemocnění	34
1.7.4.1.	Atopická dermatitida	34
1.7.4.2.	Bronchiální astma	34
1.8.	Metody stanovení BOXů	35
1.8.1.	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	35
1.8.2.	Spektroskopické analýzy	36
1.8.2.1.	UV/VIS spektroskopie	36
1.8.2.2.	Infračervená spektroskopie	36
1.8.2.3.	Nukleární magnetická rezonance (NMR)	37
1.8.2.4.	Hmotnostní spektrometrie (MS)	39
2.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
2.1.	Použité chemikálie	40
2.2.	Použité přístroje	41
2.3.	Postupy	42
2.3.1.	Příprava purifikovaného bilirubinu IX- α	42
2.4.	Postupy přípravy oxidačních produktů bilirubinu	43
2.4.1.	Metoda přípravy BOXů a MVM podle Kranc et al.	43
2.4.2.	Modifikovaná metoda přípravy BOXů	44
2.4.3.	Metoda přípravy BOXů radioaktivním ozařováním	44
2.4.4.	Extrakce BOXů z heminu	45

2.4.5.	Extrakce BOXů z hemoglobinu	45
2.5.	Analýza BOXů	45
2.5.1.	HPLC	45
2.5.2.	Analýza BOXů pomocí hmotnostní spektrometrie	46
2.5.2.1.	Analýza BOXů pomocí MS z najímaných frakcí z HPLC	46
2.5.2.2.	Analýza BOXů pomocí HPLC/MS s trojitým kvadrupólem	46
2.5.3.	Fluorescenční emisní spektra BOXů	46
2.6.	Stabilitní studie BOXů	47
2.6.1.	Stanovení časové stability BOXů v butylacetátovém roztoku	47
2.6.2.	Stanovení teplotní stability BOXů v butylacetátovém roztoku	47
2.7.	<i>In vitro</i> experimenty	47
2.7.1.	Příprava kultivačního média	47
2.7.2.	Příprava roztoku trypsinu	48
2.7.3.	Pasážování buněk	48
2.7.4.	Příprava buněk na experimenty	49
2.7.5.	Studium viability buněk	50
2.7.6.	Studium buněčné proliferace	50
3.	VÝSLEDKY A DISKUSE	51
3.1.	Purifikace bilirubinu IX- α	51
3.2.	Stanovení BOXů	52
3.2.1.	UV/VIS spektrometrie BOXů	52
3.2.2.	HPLC analýza připravených BOXů	54
3.2.2.1.	BOXy připravené podle metody Kranc et al.	54
3.2.2.2.	BOXy připravené modifikovanou metodou	55
3.3.	Separace analytů připravených radioaktivním ozařováním	57
3.4.	Separace analytů připravených oxidací heminu	58
3.5.	Separace analytů připravených z hemoglobinu	59
3.6.	Fluorescenční analýza BOXů	60
3.7.	Stabilitní studie BOXů	61
3.7.1.	Časová stabilita BOXů	61
3.7.2.	Teplotní stabilita BOXů	63
3.8.	Analýza BOXů pomocí hmotnostní spektrometrie	64
3.8.1.	Analýza BOXů pomocí MS z najímaných frakcí z HPLC	64
3.8.2.	Analýza BOXů pomocí LC/MS	64
3.9.	<i>In vitro</i> experimenty	67
3.9.1.	Spektrofotometrická analýza rozpustnosti BOXů ve fosfátovém pufru	67
3.9.2.	Studium vlivu směsi BOXů, UCB a heminu na viabilitu buněk	69
3.9.3.	Studium vlivu směsi BOXů, UCB a heminu na buněčnou proliferaci	71
4.	ZÁVĚR	74
5.	POUŽITÁ LITERATURA	77
6.	PODĚKOVÁNÍ	84

ÚVOD

Tato diplomová práce navazuje na dlouholetý výzkum Hepatologické laboratoře Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v oblasti protektivních aspektů katabolické dráhy hemu. Práce se zaměřuje na studium ne dosud příliš popsaných oxidačních produktů bilirubinu [1].

Bylo zjištěno, že žlučový pigment bilirubin, původně považovaný pouze za odpadní produkt katabolické dráhy hemu, patří mezi nejúčinnější endogenní antioxidanty v lidském těle. Plní významnou roli v obraně před zvýšeným oxidačním stresem způsobeným nadměrnou tvorbou volných radikálů. V přítomnosti reaktivních forem kyslíku (ROS) tvoří bilirubin oxidační produkty (tzv. BOXy), které lze detekovat v biologickém materiálu a které slouží jako marker oxidačního stresu [2].

Mimo jiné se bilirubin uplatňuje i v ochraně proti oxidaci lipoproteinů o nízké hustotě (LDL), zabraňuje oxidaci proteinů, snižuje karboxylaci bílkovin [3] a je také silným inhibitorem enzymu NADPH-oxidázy [4].

Studie provedené v posledním desetiletí dokazují, že oxidační produkty bilirubinu mají vazoaktivní vlastnosti. Vznikají například při subarachnoidálním krvácení (SAH) a spolupodílejí se na patogenezi komplikací tohoto onemocnění, zejména na vzniku vazospasmů [4, 5, 6, 7]. BOXy jsou považovány za alkylační činidla s přímým účinkem na hladké svalstvo [1, 8].

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zavedení analytických metod pro stanovení a charakteristiku oxidačních produktů bilirubinu, především metod vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), izolace těchto produktů a následně jejich použití pro studium jejich biologických účinků *in vitro* na buňkách lidského neuroblastomu SH-SY5Y.

1 LITERÁRNÍ ÚVOD

1.1 Oxidační stres

Pojem oxidační stres vyjadřuje dysbalanci mezi oxidační a antioxidační aktivitou, tedy stav oxidačně-antioxidační nerovnováhy. K jeho vzniku dochází v důsledku zvýšené produkce volných radikálů [9], mezi které řadíme oxidační produkty kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) [10, 11]. ROS i RNS ve fyziologických koncentracích jsou velmi podstatnou součástí zdravě fungujícího metabolického aparátu organismů [12], uplatňují se zejména jako signální molekuly v řadě metabolických drah a také při tvorbě energie zprostředkováním radikálových reakcí [1].

Oxidační stres je spojen s patogenezí různých onemocnění, jako jsou nádorové choroby, diabetes mellitus, kardiovaskulární onemocnění, různá autoimunitní onemocnění, neurodegenerativní poruchy a má za následek stárnutí [13].

1.2 Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species) vznikají jako vedlejší produkty metabolismu v buňkách všech aerobních organismů (Tab. 1). Vznikají především jako produkty reakcí unikajících elektronů z dýchacího řetězce s primárními zdroji, jako např. cytochromem P450 či cytochromem b [14, 15, 16, 17, 18]. Dále mohou být generovány v řadě nonrespiračních redoxních reakcí, jako např. v reakcích flavinových oxidáz, thiolů či těžkých kovů [19, 20, 21].

Za fyziologických podmínek působí reaktivní formy kyslíku jako obrana proti xenobiotikům a cizorodým mikroorganismům. Zároveň je jejich množství regulováno a kontrolováno prostřednictvím antioxidačních mechanismů, které jsou zajišťovány endogenními či exogenními antioxidanty. V případě, že dojde k oslabení jednoho nebo více antioxidačních systémů, nebo úroveň ROSů přesáhne fyziologickou kapacitu (např. v důsledku vystavení organismu velkému množství oxidantů), hovoříme o zvýšeném oxidačním stresu. Mimo toxické účinky, které mohou být způsobeny zvýšenými koncentracemi ROS, jsou studovány známé signální funkce. Produkce ROS je místně specifická a kontrolovaná v celé řadě vývojových procesů i při odpovědi na působení stresových faktorů [22]. Signály přenášené prostřednictvím ROS mají důležité funkční faktory, jako jsou intenzita, místo a doba trvání zvýšené produkce jednotlivých forem

ROS [23]. Jedním ze signálních mechanismů využívajících ROS je tzv. redoxní signalizace, která reguluje normální fyziologické stavy, narušení této signalizace způsobuje mnoho patologických stavů a stárnutí [24].

Mezi velmi silné oxidanty patří H_2O_2 a O^{2-} , které způsobují poškození buňky buď přímo nebo prostřednictvím redukce na OH^\bullet [14].

Kompletní přehled reaktivních kyslíkových forem je uveden v tabulce 1.

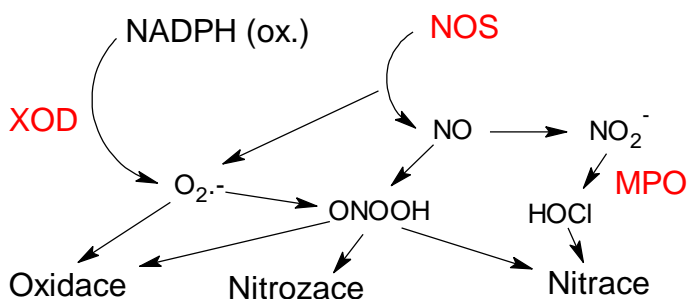
Tabulka 1 Reaktivní formy kyslíku a mechanismy jejich vzniku [18]

ROS	Název	Vznik
$O_2^{\bullet -}$	Superoxid aniont radikál	$O_2 + e^- \rightarrow$
H_2O_2	Peroxid vodíku	$O_2^{\bullet -} + e^- + 2H^+ \rightarrow$ superoxidismutáza
HO^{\bullet}	Hydroxylový radikál	$H_2O_2 + e^- \rightarrow$
ROO^{\bullet}	Peroxylový radikál	$O_2^{2-} + \text{nasyc. MK} \rightarrow$
HO_2^-	Hydrogen peroxidový aniont	$O_2^{2-} + H^+ \rightarrow$
HO_2^{\bullet}	Hydroperoxylový radikál	$O_2^{\bullet -} + H^+ \rightarrow$
1O_2	Singletový kyslík	$^3O_2 \rightarrow$ excitace
HO^-	Hydroxidový aniont	$[^{\bullet}O_2^{3-}] + H^+ \rightarrow$
O^{2-}	Oxidový aniont	$O^{\bullet -} + e^- \rightarrow$
$O^{\bullet -}$	Oxen	$[^{\bullet}O_2^{3-}] \rightarrow$
O_2^{2-}	Peroxidový aniont	$O_2^{\bullet -} + e^- \rightarrow$
3O_2	Tripletový kyslík	Přítomný ve vzduchu
O_3^-	Ozonid	$O_3 + e^- \rightarrow$

1.3 Reaktivní formy dusíku

Intenzivní výzkum v oblasti oxidu dusnatého a jeho metabolitů dal vznik novému termínu - reaktivní formy dusíku (RNS) [25]. Podle chemických kritérií RNS zahrnují pestrhou škálu sloučenin s odlišnými vlastnostmi, které mají společné odvození od NO. Nedávné studie potvrzují výrazný vliv RNS na normální fyziologické funkce a také určitý význam při patogenezi nemocí [26].

V biologických systémech je primárním zdrojem RNS oxid dusnatý, viz obrázek 1 [27].



Obr. 1 Vznik reaktivních forem dusíku [27]

Rychlé reakce NO s volnými radikály dávají vznik RNS. Tvorbu RNS lze nejlépe popsat reakcí NO s O₂⁻ za vzniku peroxonitritu (ONOO⁻), obrázek 1. Peroxonitrit je za fyziologických podmínek nestabilní a izomeruje se na dusičnany [28]. Bylo prokázáno, že ONOO⁻ se může vázat na thiolové skupiny v proteinech a vytvářet thiyl-radikály, což vede k thiolové oxidaci [29, 30].

1.4 Antioxidační systém

S objevením se kyslíku v biosféře si všechny aerobní organismy vyvinuly řadu ochranných mechanismů, díky nimž jsou schopné čelit metabolickým a environmentálním formám toxicity kyslíku. Tuto ochranu zajišťují látky zvané antioxidanty, mezi které řadíme jak enzymy, které působí jako lapače volných radikálů, tak i malé neenzymatické molekuly, které pomáhají zachovat snížený oxidační stav buňky. Antioxidanty jsou ve své podstatě redukčními sloučeninami, které

snadno reagují s oxidačními substancemi a tím chrání před oxidací důležitých molekul.

Mezi biologické antioxidanty řadíme vitaminy C a E, ubiquinol, některé karotenoidy, bilirubin, kyselinu močovou a glutathion (GSH).

GSH (tripeptid- γ -glutamylcysteinylglycin) svoji sulfhydrylovou část používá jako donor elektronu pro oxidované molekuly [15, 17].

Přehled antioxidantů je uveden v tabulce 2 [1].

Dále sem můžeme zařadit antioxidační molekuly, jako je například thioredoxin, obsahující redox-aktivní thiolové skupiny [19, 21], a hlavní buněčný reduktant NADPH. Tento dipyridinový nukleotid, ačkoli není považován za typický antioxidant, má zásadní vliv na rezistenci vůči oxidačnímu stresu, neboť poskytuje redukční ekvivalenty potřebné k regeneraci GSH a redukci thioredoxinu. Enzymy, které detoxifikují meziprodukty reaktivních forem kyslíku pomocí redukčních a oxidačních přeměn na méně reaktivní formy, jsou superoxiddismutáza, kataláza a hemoxygenáza. Superoxiddismutáza, která je důležitá při ochraně buněčných složek před oxidačním stresem, je schopna rozložit dva superoxidové radikály na molekulu O_2 a méně škodlivý H_2O_2 , který je pak zachycen katalázou a rozdělen na O_2 a H_2O [31].

Dále budou popsány už jen enzymy a antioxidační látky, které jsou pro účel této diplomové práce nejdůležitější, těmi jsou enzym hemoxygenáza a žlučový pigment bilirubin v katabolické dráze hemu.

Tabulka 2 Antioxidační substráty [1, 32, 33, 34, 35]

Bilirubin

Kyselina askorbová (vitamin C)

Glutation

Kyselina lipoová

Kyselina močová

Karotenoidy (vitamin A)

α – tokoferol (vitamin E)

Ubichinol (koenzym Q)

Albumin

Transferin

Laktoferin

Feritin

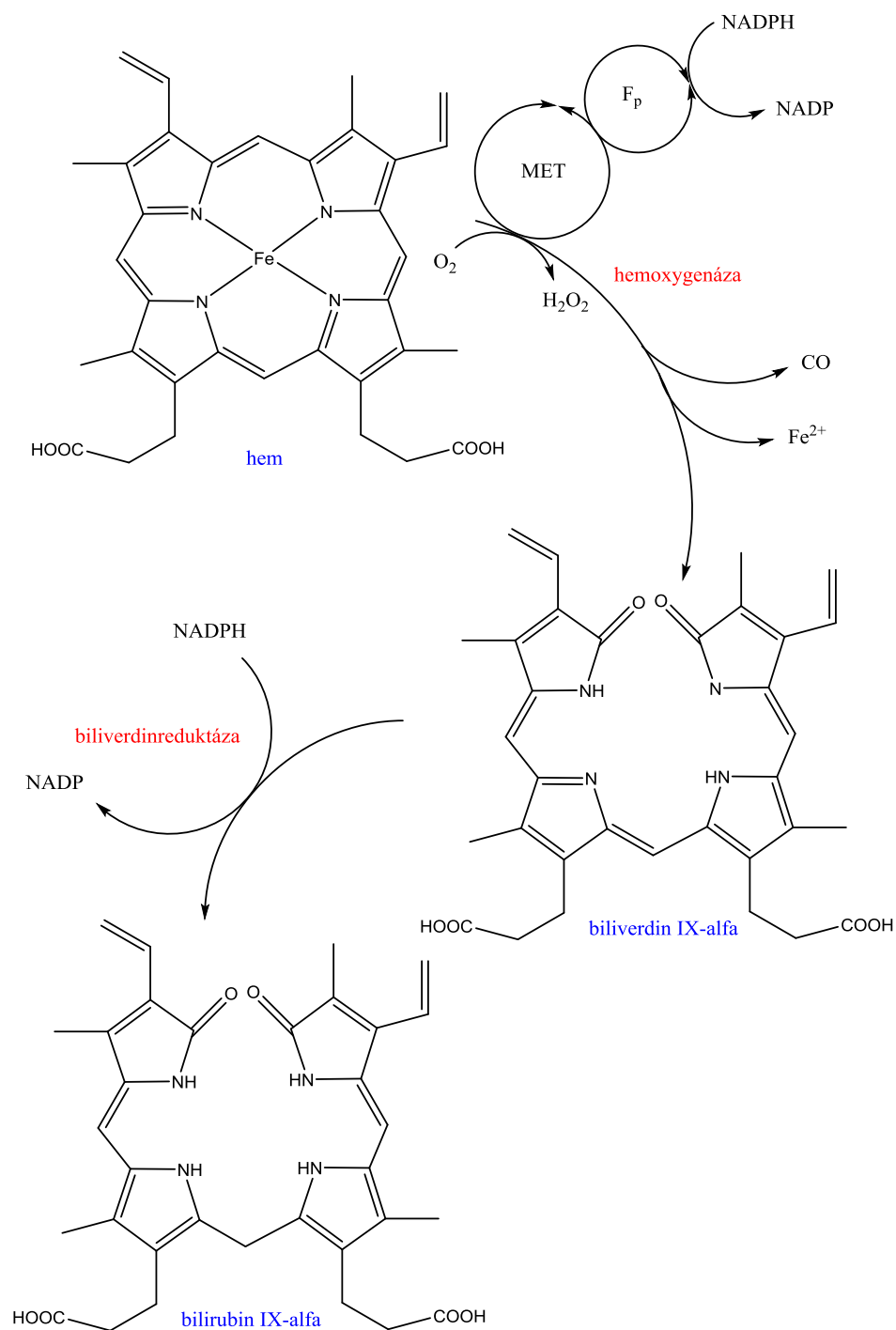
Haptoglobin

Hemopexin

Ceruloplazmin

1.5 Katabolická dráha hemu

Hem je cyklický porfyrin tetrapyrrolového charakteru s typickým červenohnědým zbarvením, který má centrálně navázaný atom železa. Pomocí mikrosomálního enzymu hemoxygenázy (HMOX) dochází k degradaci hemu na zelený pigment biliverdin IX α . Enzym HMOX katalyzuje oxidativní štěpení α -methinového můstku, přičemž vzniká jako produkt oxid uhelnatý, který difunduje z buněk a je přenášen krví do plic, ze kterých je vyloučen. Následně dochází účinkem enzymu biliverdin-reduktázy k redukci centrální methinové skupiny biliverdinu IX α a tvorby bilirubinu IX α (Obr. 2) [36].

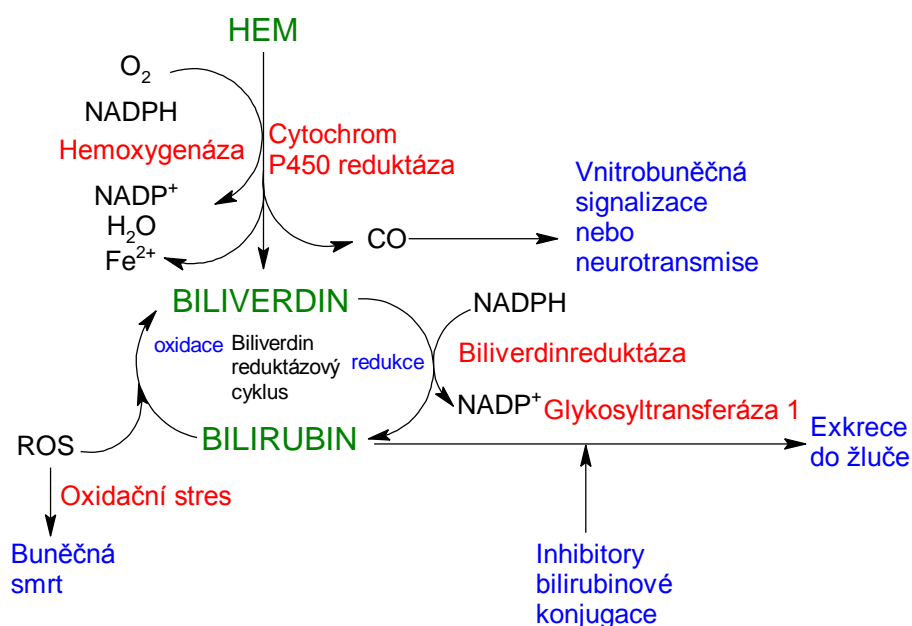


Obr. 2 Katabolická dráha přeměny hemu na bilirubin IX α ; MET = mikrosomální elektronový transportní systém, $R^1 = -CH_3$, $R^2 = -CH=CH_2$, $R^3 = -CH_2-CH_2-COOH$, F_p = flavoprotein [37]

1.5.1 Hemoxygenáza

Důležitým enzymem katabolické dráhy hemu je hemoxygenáza (HMOX) [38], katalyzující přeměnu toxického hemu, který vznikl degradací červených krvinek ve tkáních (zejména ve slezině). V této reakci je HMOX enzymem určujícím rychlost. Škodlivý hem je účinkem enzymu HMOX přeměněn na volné dvojmočné železo, oxid uhelnatý a zelený biliverdin, který je následně enzymem biliverdinreduktázou velmi rychle přeměněn na žlutý pigment bilirubin (Obr. 2) [39]. Tyto metabolity mohou spouštět signální dráhy, které slouží jako antioxidační obrana, a chránit tak organismus před patologicky zvýšeným oxidačním stresem a souvisejícími onemocněními. Hemoxygenáza (HMOX) má dvě izoformy – HMOX 1 (inducibilní) a HMOX 2 (konstitutivní) - přítomné prakticky ve všech tkáních. Za normálních podmínek je aktivní HMOX-2, která je exprimována zejména v centrálním nervovém systému (CNS) [35, 40]. HMOX-1 se aktivuje jako odpověď na celou řadu podnětů, které by mohly být pro buňku škodlivé, např. oxidační stres, akumulace hemu, tepelný šok, protizánětlivé cytokiny a toxiny. Za těchto podmínek HMOX-1 zvyšuje svoji aktivitu, přispívá tak k celkové ochraně organismu [41, 42].

V posledních několika letech se ukázalo, že forma HMOX-1 je obzvláště atraktivní nástroj pro prevenci a léčbu široké škály lidských i zvířecích onemocnění, charakterizovaných zvýšenými hladinami ROS [43]. HMOX-1 snižuje cytotoxické vlastnosti ROSů nepřímo, a to interakcí s produkty vznikajícími v průběhu katabolismu hemu, bilirubinem a NADPH-oxidázou (Obr. 3) [39].



Obr. 3 Schéma katabolické dráhy hemu, antioxidační vlastnosti bilirubinu [1]

1.5.2 Oxid uhelnatý

Původně se předpokládalo, že oxid uhelnatý (CO), který vzniká jako vedlejší produkt katabolismu hemu je pouze toxický odpadní produkt a nemá žádné další účinky či využití. Avšak v současné době se objevuje stále více důkazů o tom, že CO, podobně jako oxid dusnatý, má řadu účinků působících jako ochrana pro buňky a tkáně.

Bylo prokázáno, že CO aktivuje rozpustnou guanylátcyklázu a zvyšuje nitrobuněčnou koncentraci cyklického guanylát monofosfátu (cGMP) [44].

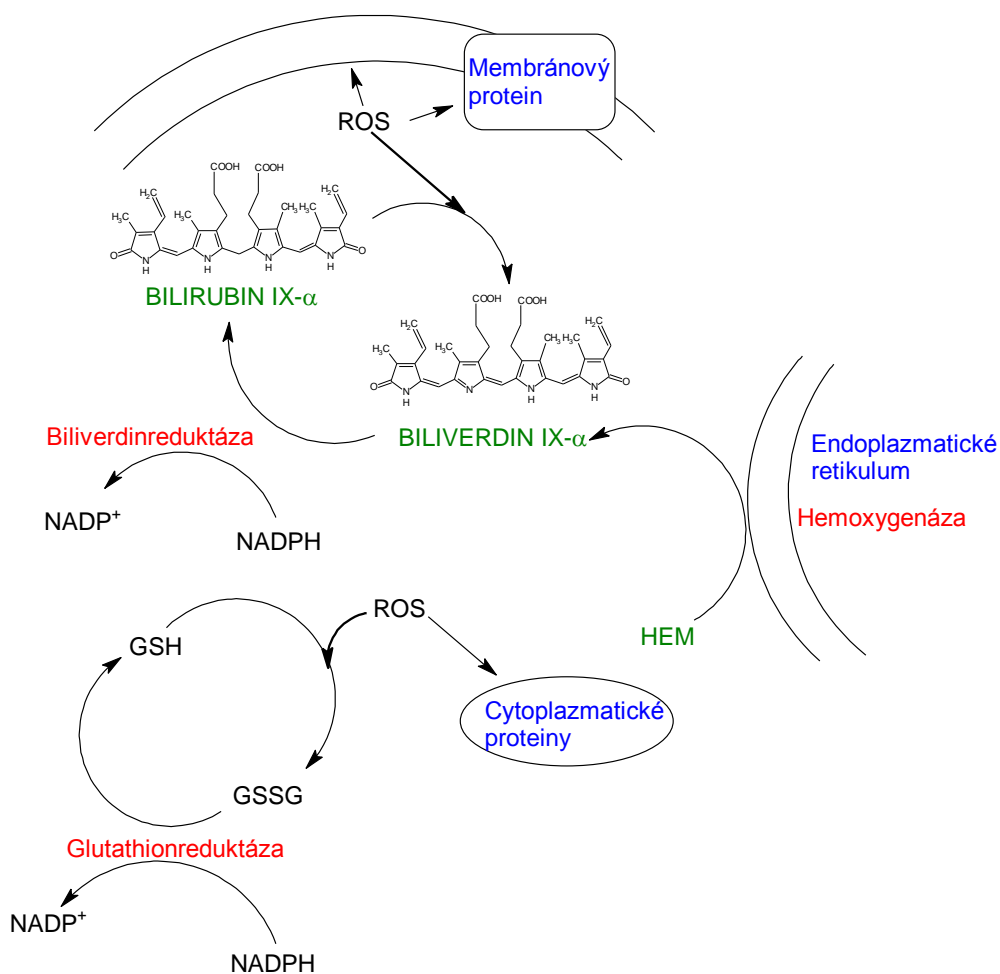
Zvýšené hladiny cGMP přímo-úměrně inhibují agregaci destiček [45], což způsobuje relaxaci hladké svaloviny [46] a následnou změnu krevního tlaku [47, 48]. CO má také nepřímý vliv na cévní tonus prostřednictvím inhibice vazokonstrikčního proteinu endothelinu typu 1 a destičkového růstového faktoru B (PDGF) [46].

Byl také zjištěn vliv CO na inhibici T-lymfocytů [49] a endoteliálních buněk [50], epitelu dýchacích cest [51] a hladké svalové buňky. Kromě známé modulace guanylátcyklázy - cGMP, CO ovlivňuje mnoho intracelulárních signálních drah, včetně p38 mitogen aktivované proteinové kinázy, exprese cyklinu D1 [51, 52, 53, 54] a cyklin A [53], aktivitu p21 (Cip) dependentní kaspázy a zejména kaspázy 8 [51], NF-κB hypoxii vyvolávající faktor 1, cévní endoteliální růstový faktor [55],

JNK-signální dráhu a transkripční faktor AP-1 [56]. CO hraje také významnou roli v potlačení rejekčních reakcí transplantátů [57].

1.5.3 Biliverdinreduktáza

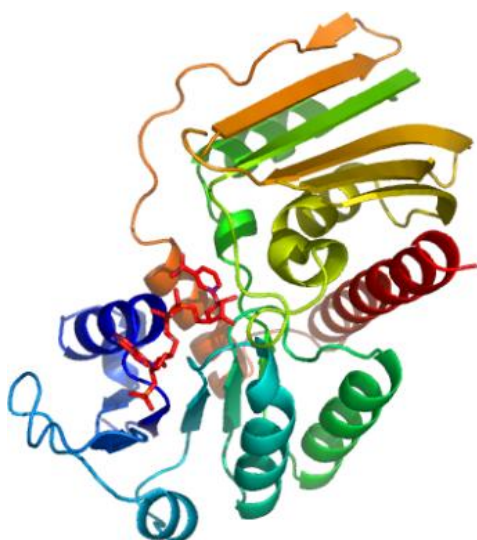
Enzym biliverdinreduktáza (BLVRA) se uplatňuje při přeměně otevřeného tetrapyrrolu biliverdinu na bilirubin (Obr. 3) v takzvaném bilirubin/biliverdin redoxním cyklu katalyzovaném BLVRA (Obr. 4) [58].



Obr. 4 Model cytoprotektivních účinků biliverdin reduktázy, BLVRA udržuje lineární tetrapyrrol v redukované formě, kde se sdružuje s membránou a snižuje šíření ROS. Tento efekt poskytuje antioxidační ochranu membránových složek buňky v podstatě stejným způsobem jako rozpustný glutation a glutationreduktáza (GR), která také chrání buněčné komponenty [58]

Podle recentních prací je zřejmé, že BLVRA (Obr. 5) má mnohem více bioaktivních funkcí než se doposud předpokládalo [59]. Ačkoliv je primárně lokalizována v cytoplasmě, byla popsána jaderná translokace BLVRA, kterou spouští oxidačním stresem indukovaný transkripční faktor pro aktivační protein [60]. Experimentálně bylo zjištěno, že subkutánní podání BLVRA zmírňuje experimentálně autoimunitní encefalomyelitidu na krysím modelu, dokonce efektivněji než po podání tradičních antioxidačních enzymů, včetně superoxiddismutázy, katalázy, glutathionreduktázy a HMOX-1. V této studii bylo také dokázáno, že při deficienci BLVRA v buňkách dochází k výraznému nárůstu ROS a snížení BLVRA také vede k poklesu životaschopnosti buněk více než o 60 % [61].

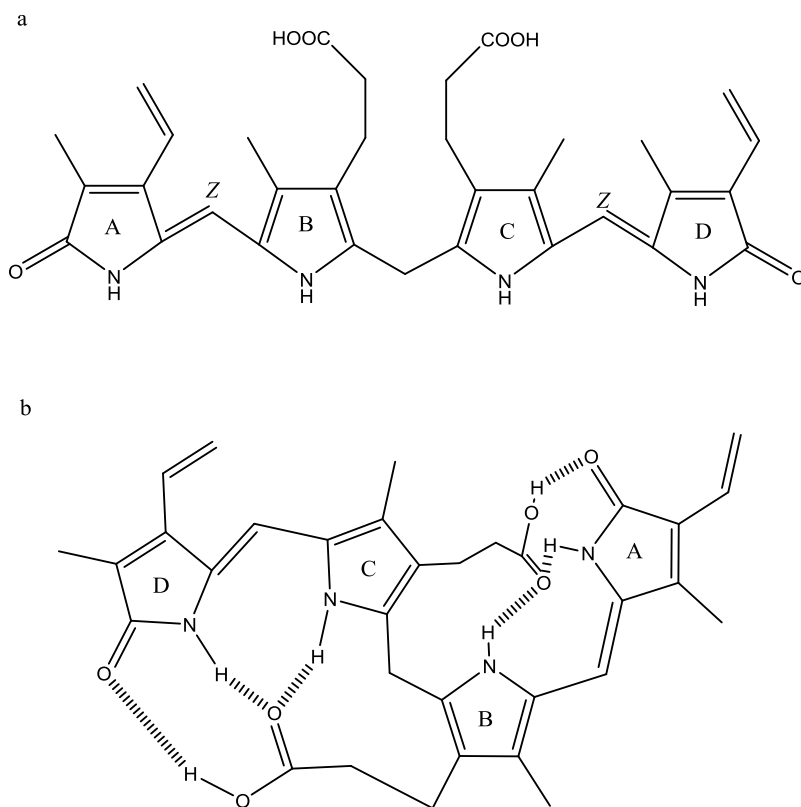
V dalších studiích je popisována protektivní úloha BLVRA v mnohých biologických systémech, včetně sliznice gastrointestinálního traktu [62], ledvin [63], centrálního a periferního nervového systému [64].



Obr. 5 Struktura biliwerdinreduktázy [65]

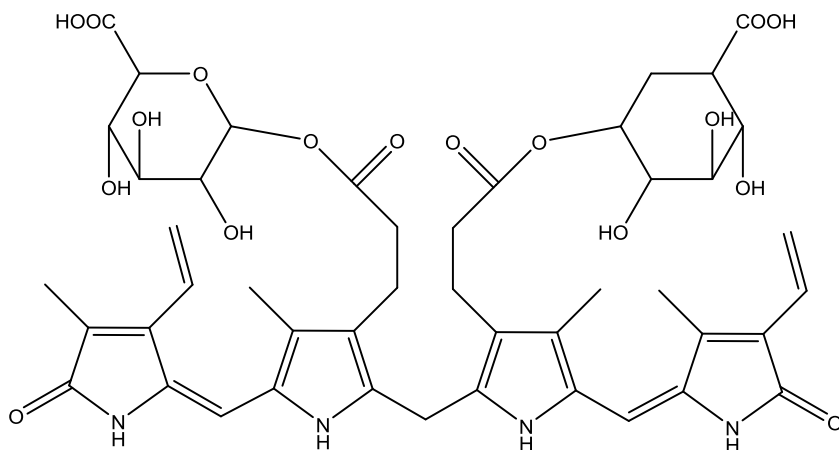
1.5.4 Bilirubin

Bilirubin je žlučový pigment žluté barvy, jeho molekula je lineární tetrapyrrol nepolárního charakteru. Přirozeným izomerem bilirubinu vyskytujícím se v organismu je bilirubin IX α (4Z,15Z) (Obr. 6a). Tato struktura a konformace zapříčiňuje vznik vodíkových vazeb mezi postranním řetězcem tvořeným kyselinou propionovou na kruhu B a polárními skupinami na kruhu D a mezi postranním řetězcem tvořeným kyselinou propionovou na kruhu C a polárními skupinami na kruhu A (Obr. 6b). Díky těmto intramolekulárním vodíkovým vazbám dochází ke konformačním změnám, které způsobují uzavírání polárních skupin do středu molekuly, z čehož vyplývá hydrofobnost a rigidita molekuly [66].



Obr. 6 Struktura a konformace bilirubinu a) lineární tetrapyrrolová struktura přirozeně se vyskytujícího izomeru bilirubinu IX α , b) planární trojrozměrná konformace molekuly bilirubinu IX α se zobrazenými vodíkovými můstky [37]

V těle lze bilirubin najít také v několika podobách a to jako nekonjugovaný bilirubin (UCB) navázaný na albumin, bilirubin konjugovaný s kyselinou glukuronovou (Obr. 7) a toxický volný bilirubin (Bf) nevázaný na albumin



Obr. 7 Konjugovaný bilirubin s kyselinou glukuronovou (bisglukuronozyl-bilirubin) [1]

Přibližně 80 % celkového bilirubinu je produkováno odbouráváním hemu z hemoglobinu přestárých červených krvinek [1] a dalších 20 % pochází z přeměny proteinů obsahujících hem (např. cytochromy, myoglobin, kataláza) [67].

Pro degradaci hemu jsou nejlépe přizpůsobeny buňky retikuloendotelového systému kostní dřeně, jater a sleziny. Bilirubin je konečným produktem katabolické dráhy hemu (Obr. 2), jeho denní produkce u dospělého člověka se pohybuje v rozmezí 450 - 600 μmol (250 - 350 mg) [1]. Jakožto silný antioxidant je schopný chránit buňky před oxidativním poškozením volnými radikály [68]. Bilirubin je z těla vylučován v jeho polárnější formě, kterou jsou konjugáty s kyselinou glukuronovou (monokonjugáty a biskonjugáty (Obr. 6)), které vznikají v játrech účinkem enzymu bilirubin UDP-glukuronosyltransferázy (UGT1A1). Konjugovaný bilirubin je pak vyloučen do žluči, odkud odchází do gastrointestinálního traktu a je vylučován po své dekonjugaci ve střevním lumen buď jako UCB nebo ve formě dalších redukčních derivátů souborně nazývaných urobilinoidy [1, 37].

Jeho tvorba, vylučování a metabolismus jsou udržovány v rovnováze [40]. Pokud dojde k porušení této rovnováhy, začne docházet ke kumulaci bilirubinu v systémové cirkulaci a tkáních, a dochází k tzv. hyperbilirubinémii [69]. Výzkum

několika posledních desetiletí dokazuje, že mírně zvýšené hladiny bilirubinu v séru mají díky jeho silným antioxidačním vlastnostem protektivní účinek pro organismus [70]. Například u jedinců s Gilbertovým syndromem (genetická porucha, díky níž mají tito jedinci nižší aktivitu enzymu UGT1A1), kteří mají přirozeně zvýšené hladiny bilirubinu v těle (až do 70 μ M), je nižší výskyt běžných civilizačních onemocnění, jako jsou například kardiovaskulární nebo nádorová onemocnění [70, 71].

U obojživelníků, plazů a ptáků je konečným produktem katabolismu hemu biliverdin, který je ve vodě rozpustným prekurzorem bilirubinu [72]. Pravděpodobným důvodem tvorby biliverdinu místo bilirubinu u těchto živočichů je vývoj placenty, neboť polární biliverdin nemá schopnost procházet placentární bariérou, ale nekonjugovaný bilirubin tuto schopnost má, v důsledku toho nedochází ke hromadění degradačních produktů hemu v těle plodu [73].

Bilirubin společně s biliverdinem aktivují aryl-hydrokarbonový jaderný receptor (AhR) zapojený do biologických účinků různých xenobiotik, včetně kontroly buněčné proliferace, G1 fáze buněčného cyklu, fosforylace protein kinázou a transkripční aktivace regulátorů buněčného cyklu naznačující důsledky pro BVR aktivitu [74].

1.6 Biomarkery oxidačního stresu

Volné radikály díky charakteru svých molekul mohou narušovat strukturu všech typů biomolekul - lipidů, proteinů, nukleových kyselin i sacharidů. Tato strukturální změna může být velmi škodlivá pro správnou funkci organismu a takto pozměněné molekuly mohou být značně toxické a spouštět celou kaskádu dalších poškození [75, 76].

Charakter odpovědi organismu proti oxidačnímu stresu se liší podle typu napadených buněk, povaze a místa tvorby reaktivních kyslíkových radikálů. Poločasy života ROS bývají většinou krátké (několik sekund), proto je nezbytné najít látky, pomocí nichž by bylo možné stanovovat ROS *in vivo*. Tyto látky se nazývají „biomarkery oxidačního stresu“, díky nim může být stanoven rozsah oxidačního poškození a také původce oxidantu [77, 78, 79, 80]. Biomarkery oxidačního stresu jsou důležité pro predikci následků oxidace a na jejich základě lze vypracovat vhodné postupy vedoucí k zabránění nebo zmírnění poškození. Dělí se do dvou kategorií:

- 1) molekuly modifikované reaktivními formami kyslíku
- 2) zvýšená indukce enzymů nebo antioxidantů (Tab. 3) [76].

Měření těchto biomarkerů v tělních tekutinách (např. krev, moč, mozkomíšní mok) nebo v dechu [77] umožňuje opakované sledování oxidačního stresu *in vivo*, což není možné u invazivních vyšetření, proto se zdají vhodným zdrojem pro hodnocení rozsahu oxidačního stresu. Velmi efektivním způsobem detekce ROS v živých lidských buňkách by bylo použití fluorescenčních sond [76, 81], avšak tato metoda není v současné době v klinické praxi možná [80].

Tabulka 3 Dvě kategorie biomarkerů oxidačního stresu [9]

Modifikované molekuly reaktivními formami kyslíku	
Peroxidace lipidů	Malonodialdehyd, 4-hydroxy-2-nonenal, akrolein-lysin, F2-isoprostan
Oxidativní poškození DNA	8-hydroxy-2'-deoxyguanosin
Glyko-oxidace	Karboxymethyllysin, pentosidin, argpyrimidin, methylglyoxal
Nitro-oxidace	Nitrotyrosin, nitrit/nitrat
Ostatní	o,o'-dityrosin, ortho-tyrosin, oxidativní metabolity bilirubinu, dehydroaskorbát, oxidovaný glutation, reaktivní sloučenina kyseliny thiobarbiturové
Antioxidační enzymy a molekuly	
Enzymy	Superoxiddismutáza, kataláza, glutationperoxidáza, glutationreduktáza, glutation-S-transferáza, thioredoxinreduktáza, HMOX, BLVRA
Proteiny	Albumin, ferritin, transferin, lactoferrin, ceruloplasmin, thioredoxin, protein vázající mastné kyseliny (FABP)
Nízkomolekulární molekuly	Bilirubin, tokoferoly, karotenoidy, ubichinol/ubichinon, askorbát, glutation, cystein, kyselina močová, dusitany/dusičnany, selen
Ostatní markery	stanovení celkové antioxidační aktivity

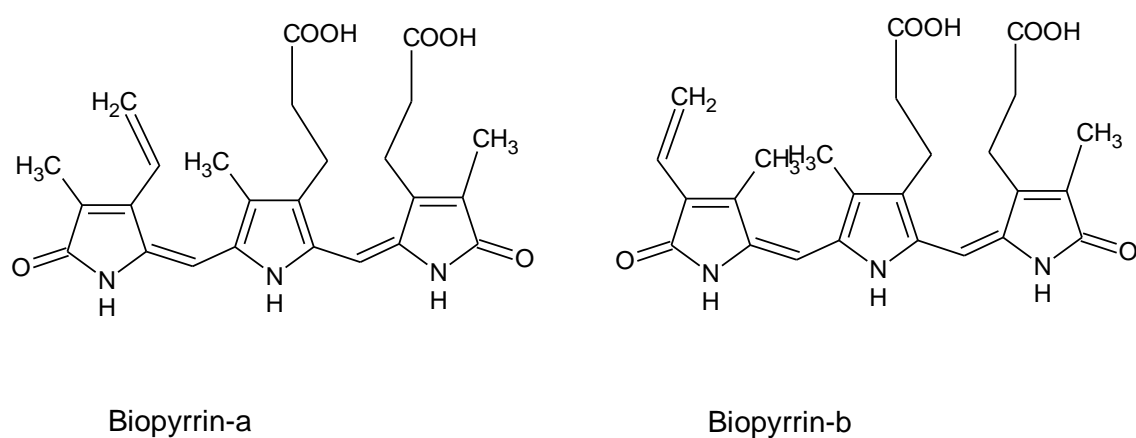
Jedním ze slibných nástrojů detekce oxidačního poškození by mohly být molekuly, které vznikají reakcí bilirubinu s ROSy tzv. oxidační produkty bilirubinu, zdají se být dokonce lepším nástrojem pro detekci oxidačního stresu než samotný bilirubin [82, 83, 84].

1.6.1 Oxidační produkty bilirubinu

Oxidační produkty bilirubinu byly identifikovány na konci 20. století, jako přímé metabolity bilirubinu [5]. V literatuře se můžeme setkat i s dalším názvem, oxidační

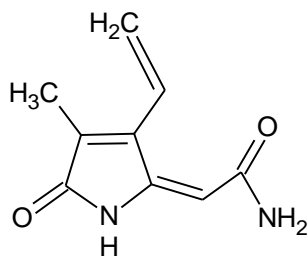
metabolity bilirubinu (BOM) [83]. Tyto molekuly vznikají reakcí bilirubinu s ROSy a můžeme se setkat s monopyrrolovými, dipyrrolovými a tripyrrolovými molekulami.

Nejvíce publikovaných prací se zabývá látkami zvanými biopyrriny, které je možné snadno detekovat v moči jedinců vystavených oxidačnímu stresu. Pro zjištění koncentrace biopyrrinů jsou komerčně dostupné kity založené na imunologických metodách (Biopyrrin ELISA kit) [82, 83, 84]. Metoda stanovení je založena na reakci biopyrrinů s anti-bilirubin monoklonálními protilátkami, 5M2 a 24G7. Z moči zdravých dobrovolníků byly izolovány dva typy biopyrrinů (a, b) (Obr. 8) [84, 85].

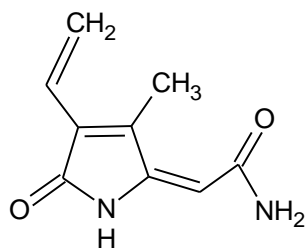


Obr. 8 Strukturní vzorce biopyrrinů (a, b) [71]

Předmětem této diplomové práce jsou monopyrrolové zbytky bilirubinu, které se liší polohou methylesteru a vinylu, které byly pojmenovány BOX A a BOX B (Obr. 9) [5]. Jejich zvýšená hladina by mohla být markerem zvýšeného oxidačního stresu.



BOX-A



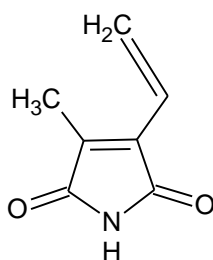
BOX-B

Obr. 9 Strukturní vzorce BOXů:

BOX-A (4-methyl-5-oxo-3-vinyl-(1,5-dihydropyrrol-2-ylidene)acetamid,

BOX-B (3-methyl-5-oxo-4-vinyl-(1,5-dihydropyrrol-2-ylidene)acetamid [7]

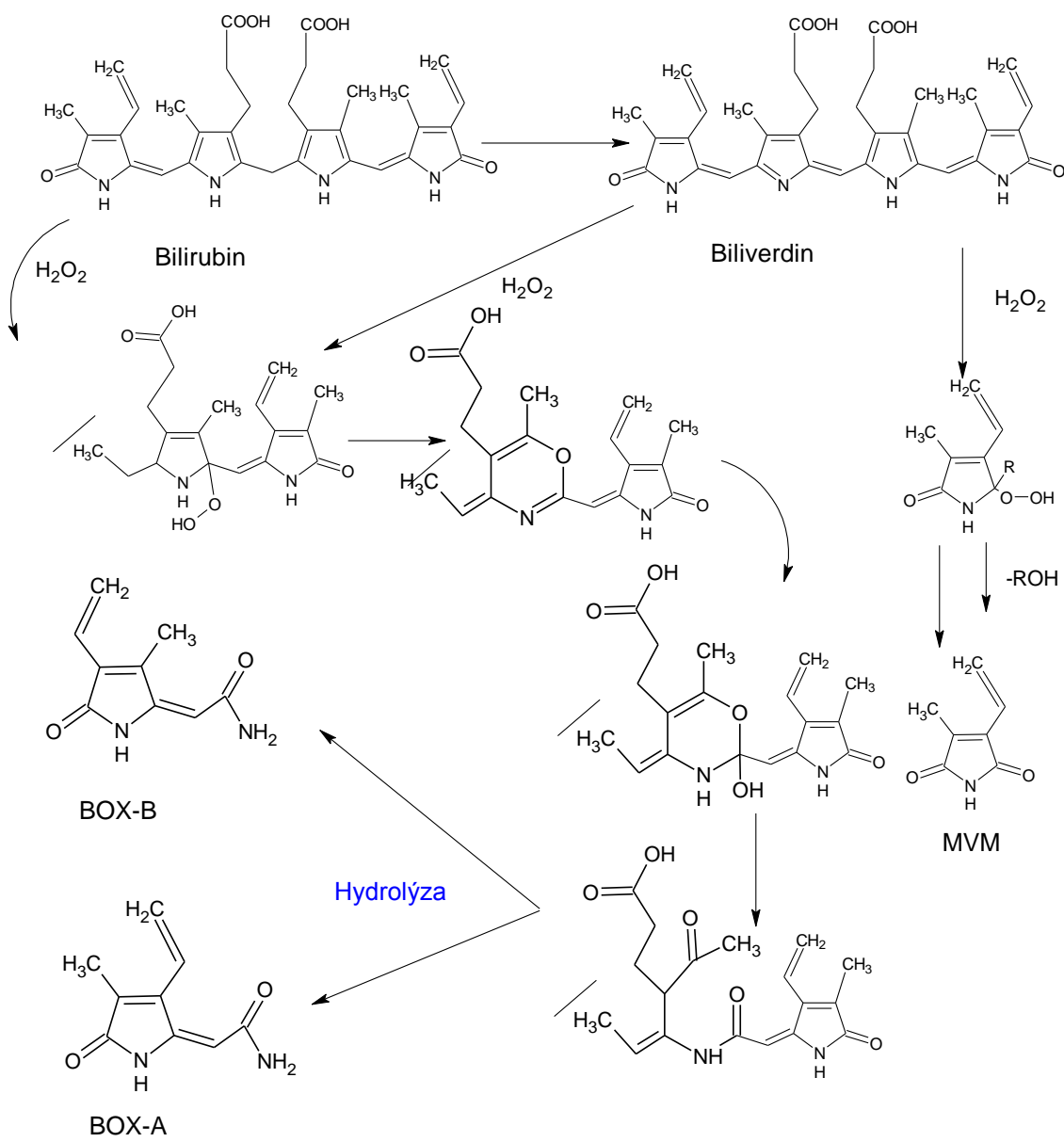
BOX A a BOX B jsou nepříliš prozkoumané a popsané látky, které byly nalezeny v mozkomíšním moku pacientů po SAH. Společně s nimi byla nalezena i sloučenina 4-methyl-3-vinylmaleimide (MVM) (Obr. 10), která je zřejmě metabolitem jak bilirubinu, tak biliverdinu. Otázkou stále zůstává jejich role v organismu. Podle souhrnu publikovaných dat se však lze domnívat, že jsou látky spíše pro organismus škodlivé [5, 8].



MVM

Obr. 10 Strukturní vzorec 4-methyl-3-vinylmaleimidu [5]

V roce 2000 byla popsána možná cesta biosyntetického vzniku BOXů a MVM (Obr. 11) [5].



Obr. 11 Nákres možné biosyntetické cesty vzniku BOXů a MVM z bilirubinu a biliverdinu iniciované peroxidem vodíku, R - část bilirubinové molekuly [5]

1.7 Onemocnění spojená s oxidačním stresem

S oxidačním stresem je spojená řada onemocnění, k jejichž vzniku dochází v okamžiku, kdy se organismus není schopen bránit vznikajícím volným radikálům. Mezi tato onemocnění patří kardiovaskulární onemocnění, nádorové choroby, onemocnění metabolická, řada alergických či imunologických onemocnění.

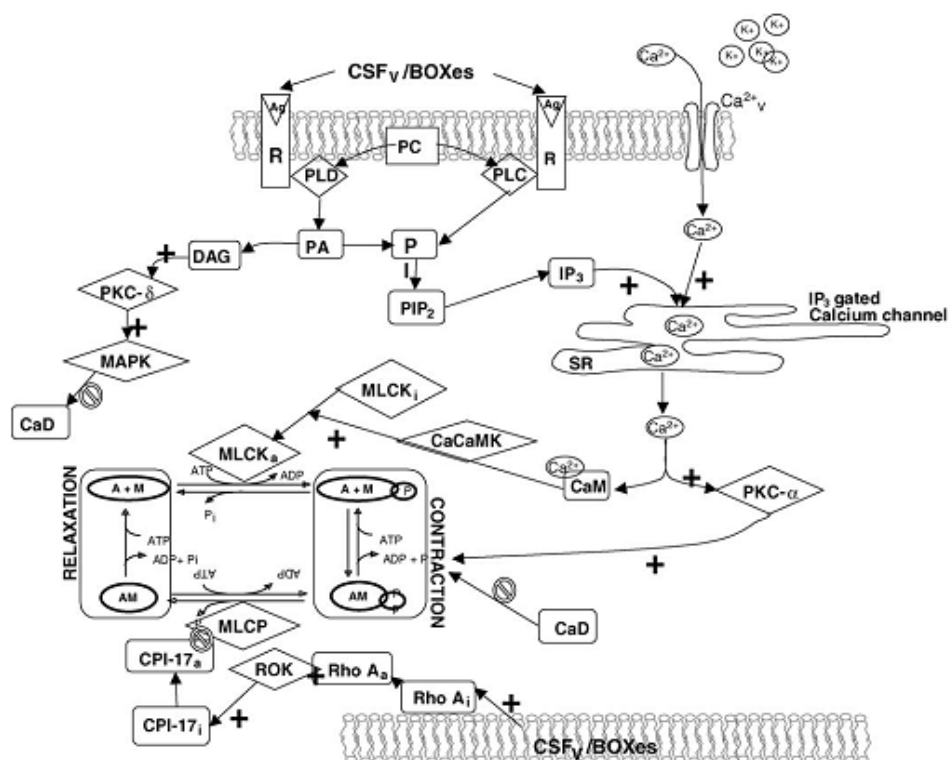
1.7.1 Kardiovaskulární onemocnění

1.7.1.1 Hypertenze

Jedním z velmi rozšířených onemocnění dnešní doby se stala hypertenze, tedy chronicky zvýšený krevní tlak. Patří mezi nejvíce rozšířené kardiovaskulární onemocnění vůbec [86]. Vznik hypertenze může být spojen také s oxidačním stresem, např. zvýšenou produkcí ROS, včetně superoxidového aniontu v cévních buňkách [87, 88, 89]. O_2^- může ovlivnit relaxační faktor endotelu, oxid dusnatý, což má za následek ztrátu biologické dostupnosti NO, který ztěžuje endoteliální funkci, z čehož vyplývá snížená vazodilatace, která může způsobit hypertenzi [90, 91].

1.7.1.2 Subarachnoidální krvácení

Subarachnoidální krvácení je cévní mozkovou příhodou s vysokou mortalitou vznikajícího často u nemocných s arteriální hypertenzí. Jedná se o krvácení do prostoru mezi pavoučnicí a měkkou plenou mozkovou. Existuje hypotéza, která popisuje komplikace u SAH způsobující vazospasmus. Vazospasmus se vyskytuje u 60 % všech případů SAH, což vede k ischemii, která způsobuje neurologický deficit nebo smrt [92]. Souvislost mezi vazospasmem a SAH je popisována již od 60. let minulého století, avšak etiologie vazospasmu není dosud známá. Látky způsobující vazospasmus by mohly být detekovány prostřednictvím analýzy mozkomíšního moku [93]. Je pravděpodobné, že na vzniku vazospasmu se uplatňují také oxidační produkty bilirubinu (Obr. 12) [7].



Obr. 12 Fyziologické mechanismy kontrakce hladké svaloviny. Tento obrázek popisuje patologické dráhy zapojené do fyziologické kontrakce a relaxace hladké svaloviny cév, jako jsou mozkové tepny. Poruchy mnoha z těchto cest jsou posuzovány, jako domnělé etiologie různých cévních patologií, včetně vysokého krevního tlaku a mozkových vazospasmů po subarachnoidálním krvácení (A = aktin, Ag = agonista, AM = aktomyozin, ATP/ADP = adenosin-tri/di-fosfát, BOXes = oxidační produkty bilirubinu, Ca^{2+} = vápník, V = napětí řízených kalciových kanálů, CaCaMK = vápník-kalmodulin-kinasa, CAD = kaldesmon, CaM = kalmodulin, CPI-17 (a/i) = MLCP inhibiční protein (aktivní/neaktivní), CSFv = mozkomíšní mok z SAH pacientů s mozkovým vazospazmem, DAG = diacylglycerol, K^+ = draslík, IP3 = inositol-3-fosfát, M = myosin, MAPK = mitogenem aktivovaná protein kináza, MLCK (a/i) = lehký řetězec myosinu (aktivní/neaktivní), MLCP = lehký řetězec myosinu fosfatázy, P = fosfát, PA = kyselina fosfatidová, PC = fosfatidyl cholin, PIP2 = fosfatidylinositol-2-fosfát, PKC = proteinkináza C, PLC = fosfolipáza C, PLD = fosfolipáza D, R = receptor, Rho A (a/i) = Rho A faktor (aktivní/neaktivní), ROK = Rho kináza, SR = sarkoplazmatické retikulum [7]

1.7.1.3 Ateroskleróza

Ateroskleróza je onemocnění postihující výstelku krevních cév. Endotelové buňky poškozené různými noxami (např. zvýšeným množstvím ROS, zvýšenou koncentrací glukózy a lipoproteinů, případně kouřením) nebo zvýšeným krevním tlakem mohou nabalovat makrofágy nebo T-lymfocyty, které přijímají lipoproteiny o nízké denzitě. Prostřednictvím lipoperoxidace, která je iniciována reaktivními formami kyslíku a dusíku se depozity lipidů přeměňují v tukové proužky a následně tvoří fibrózní pláty s cholesterolovými krystaly, do kterých se ukládá vápník a dochází tak k zvápenatění (zkornatění) cév [94]. Z klinického pohledu mají největší význam léze srdečních věnčitých tepen, dále tepen zásobujících krví mozek a také tepen zásobujících ostatní orgány [95].

1.7.2 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění patří mezi multifaktoriální nemoci, v jejichž patogenezi se uplatňuje řada faktorů.

Jednou z příčin nádorových onemocnění je chemicky indukovaná karcinogeneze, což je vícestupňový proces zahrnující poškození DNA a buněčné proliferace. Dopad chemických karcinogenů v různých stupních regulačních procesů bývá induktorem rakovinného bujení [96]. Genotoxické agens, často tvořené chemickými látkami, přímo poškozují genomickou DNA, což může mít za následek její mutace. Chemikálie této kategorie jsou často aktivovány v cílové buňce a jejich vliv na růst novotvarů je závislý na jejich koncentraci.

Druhou kategorií prokancerogenních látek jsou negenotoxické chemikálie, které působí nepřímo na poškození DNA. Proces nepřímo působících karcinogenů není přesně znám, přesto způsobují modulaci růstu buněk a buněčnou smrt. Změny genové exprese a buněčné růstové parametry jsou prvořadě v zásahu negenotoxických látek. Tyto látky často působí ve fázi propagace rakovinného procesu [97, 98].

Pomocí experimentů provedených na hlodavcích bylo možno definovat tři fáze nádorových procesů, a to iniciaci, propagaci a progresi. Iniciace neboli zahájení zahrnuje vytvoření mutované, preneoplastické buňky genotoxickou událostí. Tento jev je v buňce nevratný a je závislý na dávce genotoxikantu. Propagace zahrnuje klonální expanzi zahájenou v buňce, která vzniká v důsledku zvýšení buněčné proliferace nebo

sníženou funkcí apoptózy v cílové buněčné populaci [99]. Děje probíhající během této fáze jsou závislé na dávce škodliviny a reverzibilní po odstranění nádoru a propagačního stimulu. Třetí etapa, progres, zahrnuje buněčné a molekulární změny, které nastanou od preneoplastických po neoplastické stavy. Tato fáze je nevratná a zahrnuje genetické nestability, změny v oblasti jaderné ploidie a narušení chromozomové integrity.

Zvýšená replikace DNA a následné buněčné dělení je důležité v každé fázi rakovinného bujení [100]. Byl navržen možný mechanismus indukce rakoviny. Tento mechanismus je založen na zvýšení syntézy DNA a mitózy prostřednictvím negenotoxických karcinogenů, a tím dochází k vyvolání mutací v dělicích se buňkách a chybné reparaci. Vzhledem k neustálému dělení buněk bude mít mutace vliv na zahájení vzniku preneoplastických buněk, které se mohou proliferativně rozšířit a vytvořit nádor. Kromě toho mohou negenotoxické agens sloužit ke stimulaci selektivního klonálního růstu již spontánně iniciované buňky [101].

Ke karcinogenezi přispívá endogenní a exogenní faktory, které ovlivňují poškození DNA, růst buněk a smrt buňky. Experimentální data podporují hypotézu, že kyslíkové radikály hrají důležitou roli v rakovinném procesu. Zvýšení ROS v buňce pomocí fyziologických pochodů nebo prostřednictvím expozice karcinogenům přispívá ke tvorbě procesů karcinogeneze. Existuje velké množství experimentálních důkazů o tom, že vznikající ROS a následný oxidační stres mají výrazný vliv na velkou řadu civilizačních chorob [102].

1.7.3 Metabolická onemocnění

1.7.3.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) zahrnuje heterogenní skupinu chronických metabolických chorob, jejichž základním projevem je hyperglykemie. Vzniká v důsledku nedostatku inzulinu, jeho nedostatečného účinku (někdy se mluví o relativním nedostatku) nebo kombinací obojího [103]. Diabetes se vyznačuje vysokou koncentrací glukózy v krvi, která vede prostřednictvím několika mechanismů ke zvýšené tvorbě volných radikálových intermediátů [104, 105, 106]. Výsledná glykace, glykooxidace, karbonylace a oxidační stres vedou k patogenezi diabetu [107].

V současnosti narůstá zejména inzulin non-dependentních diabetů (typ II). Tento

jev lze pozorovat na populační studii, ze které vyplývá, že ještě v roce 1997 mělo na celém světě diabetes pouze 124 milionů lidí, (97 % z nich diabetes typu II), zatímco pro rok 2010 byl odhad lidí s diabetem vyšší než 221 milionů [108].

Vývoj diabetických onemocnění je významnou příčinou morbiditu a mortality a je stále větší zátěží zdravotnických zařízení v rozvinutých i rozvojových zemích. Velké prospektivní studie prokázaly vztah mezi glykemií a diabetickou mikrovaskulární komplikací u diabetu typu I i II. Hyperglykémie a inzulinová rezistence mají důležitou roli v patogenezi makrovaskulárních onemocnění [109].

1.7.4 Alergické/imunologické onemocnění

1.7.4.1 Atopická dermatitida

Atopická dermatitida je chronické zánětlivé kožní onemocnění neznámé etiologie. Ve studii zaměřené na výzkum poruch homeostázy kyslíkových a dusíkových radikálů u dětské atopické dermatitidy byly jako markery použity 8-hydroxy-2-deoxyguanosin (marker oxidačního stresu), poměr mezi dusitany/dusičnany (marker syntézy NO) a selen (marker seleniové mozkové mrtvice). Bylo zjištěno, že porucha homeostázy radikálů kyslíku/dusíku má výrazný vliv na patofyziologii atopické dermatitidy u dětí a potlačení oxidačního stresu by mohlo vést k léčbě atopické dermatitidy [110].

1.7.4.2 Bronchiální astma

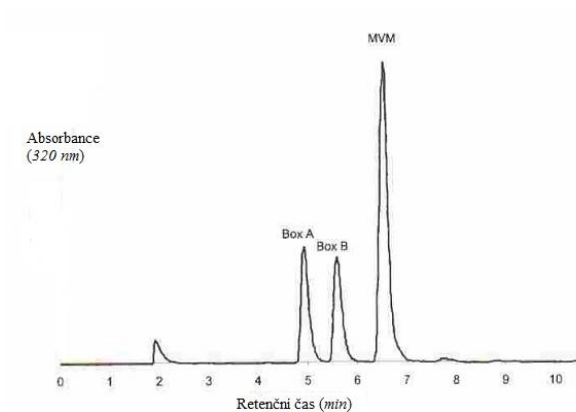
Bronchiální astma je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest doprovázené záchvatovitou dušností. Postihuje téměř všechny věkové kategorie. Je to klinický syndrom charakterizovaný zvýšenou reaktivitou tracheobronchiálního stromu na různé podněty, který se projevuje obstrukcí dýchacích cest [111]. Oxidační stres se podílí na patogenezi astmatu a klinické studie ukazují nerovnováhu mezi množstvím oxidantů a antioxidantů u pacientů trpících bronchiálním astmatem. Jako biomarkery oxidačního stresu slouží glutation a aldehydy, které se stanovují v kondenzátu vydechovaného vzduchu, využívá se k tomu analytických technik založených na metodě plynové chromatografie [112].

1.8 Metody stanovení BOXů

1.8.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Jednou z metod, kterou lze použít pro stanovení oxidačních produktů bilirubinu je metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která je založena na distribuci studovaných analytů mezi stacionární (SF) a mobilní fází (MF). Podle povahy těchto fází můžeme HPLC metody dělit na HPLC metody na normální fazi, kdy je MF nepolární a SF polární (např. silikagel), a HPLC metody na reverzní (obrácené) fazi, polarita MF a SF je opačná vzhledem k HPLC na normální fazi. Nejčastějšími nepolárními SF jsou silikagely modifikované zbytky některých uhlovodíků, nejčastěji jsou oktadecylové zbytky.

První metody stanovení BOXů pomocí HPLC byly popsány v 90. letech 20. století. Jako SF byly použity kolony Hypersil C18 (250×7 mm) a Spherisorb ODS [113] ($250 \times 4,6$ mm), jako MF byl použit 30 % (v/v) vodný roztok acetonitrilu, průtok mobilní fáze $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Metoda byla modifikována v roce 2000 skupinou profesora Krance. Byl upraven průtok mobilní fáze ($1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) a k separaci látek byl použit lineární gradient (změna z 30 % (v/v) na 36 % (v/v) vodného roztoku acetonitrilu během 8 minut), čímž došlo k urychlení separace a zároveň došlo k přesnějšímu separování analytů. Jednotlivé analyty byly detekovány při 320 nm (Obr. 13) [5]. Metoda byla dále upravena kolektivem profesora Pyne-Geithmana v roce 2008. Byla změněna stacionární fáze (kolona Symmetry C18 ($150 \times 4,6$ mm, $5 \mu\text{m}$)). Analyty byly z kolony eluovány prostřednictvím vodného roztoku acetonitrilu v gradientovém uspořádání (změna gradientu z 5 % na 50 %). Zkoumané látky byly detekovány při 310 nm, teplota kolony byla nastavena na 35°C [114].



Obr. 13 HPLC chromatogram analýzy BOXů skupiny Kranc et al., kolona Sperisorb ODS (250 × 4,6 mm) [5]

1.8.2 Spektroskopické analýzy

1.8.2.1 UV/VIS spektroskopie

Další metodou vhodnou k detekci BOXů je spektroskopie v UV a VIS oblasti, kde podle specifických absorpčních maxim lze určit přítomnost hledaných látek ve vodném roztoku.

Ve studované literatuře byla UV/VIS spektroskopie provedena v ddH₂O na spektrofotometru Ultrospec 4000. BOX A vykazoval nejvyšší absorbanci při vlnových délkách 215 a 300 nm, BOX B při 215 a 310 nm [5].

1.8.2.2 Infračervená spektroskopie

Pro určení struktury BOXů je možno také využít metodu infračervené spektroskopie. První IR spektra byla měřena na přístroji Perkin Elmer FT-IR s rozlišením 4 cm⁻¹. BOX A vykazoval spektra 3434,0 (N-H); 1698,2 (C = O, laktam); 1666,4 (C = O, amid); 1430,5 a 1292,7 cm⁻¹. BOX B vykazoval spektra 3435,7 (N-H); 1654,1 (C = O, laktam); 1647,9 cm⁻¹ (C = O, amid). MVM vykazoval spektra 3436,2 (N-H); 2103,9; 1773,7; 1713,0; 1639,6 cm⁻¹ [5].

1.8.2.3 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

NMR spektroskopie je metoda sloužící k určení struktury látek. NMR spektra BOXů byla poprvé stanovena pomocí přístroje Bruker AMX500 (500MHz) při 300 K. Byla provedena heteronukleární korelace, spektra byla zaznamenána s přechodem výběru a bez low-pass filtru. Pomocí NMR byly identifikovány charakteristické dubletové struktury $^1J_{CH}$, jako širokopásmový uhlíkový dekapling. Všechny ^{13}C chemické posuny byly získány nepřímo z korelačních píků 2D spekter. Vodíkové spektrum (měřené v CD_3CN) demonstrovalo přítomnost vinylové $-CH=CH_2$ skupiny s ostrým singletem, což koreluje se vzdálenou alkenovou skupinou. Přítomnost této skupiny také způsobuje dvě rezonance ve vodíkovém spektru, které nebyly přítomny při měření v D_2O /acetonitril. Tyto rezonance připomínají přítomnost primární amidové skupiny NH_2 , ve které byly dva vodíky diferenciované v důsledku omezeného otáčení amidové vazby. Další rezonance byla pozorována při posunu 9,69 p.p.m., což odpovídá přítomnosti pyrrolového jádra. Tyto údaje spolu s přítomností tří singletových vodíků s posunem 1,98 p.p.m. potvrzují vznik pyrrolu s navázanou methylovou a vinylovou skupinou fragmentací z bilirubinu. Přehled všech posunů (Tab. 4) [5].

Tabulka 4 ^1H a ^{13}C NMR (500 MHz) [5]

	^1H NMR (100 % CD_3CN)	^{13}C NMR ($\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$)
	p.p.m	p.p.m
BOX-A		
1	9,69	-
2	-	147,0
3	-	140,7
4	-	131,5
5	-	173,8
1'	5,62	99,1
2'	-	169,7
3-vinyl-CH	6,57	125,3
3-vinyl-CH ₂	5,68; 5,71	124,6
4-CH ₃	1,98	9,1
NH ₂	6,37/5,86	-
BOX B		
1	9,49	-
2	-	147,9
3	-	142,7
4	-	129,2
5	-	173,0
1'	5,55	99,0
2'	-	170,2
3-vinyl-CH	6,62	125,7
3-vinyl-CH ₂	5,52; 6,32	122,4
4-CH ₃	2,07	9,1
NH ₂	6,37/5,86	-
MVM		
1	7,19	-
2	-	170,2
3	-	134,3
4	-	136,7
5	-	171,4
3-vinyl-CH	6,55	124,2
3-vinyl-CH ₂	6,40; 5,73	125,9
4-Me	2,07	8,3

1.8.2.4 Hmotnostní spektroskopie (MS)

Jednou z posledních metod, která nám může posloužit k přesnému zjištění struktur studovaných analytů, je hmotnostní spektroskopie. 10 μ l připravených BOXů bylo analyzováno pomocí elektrospejové ionizace na přístroji Micromass BioQ II-ZS s tripl-kvadrupólovým analyzátozem. Pozitivní ionty spektra byly získány z nástríku roztoku voda/acetonitril (1/1, v/v) s přidavkem 0,2 % kyseliny mravenčí s napětím + 30 V. Negativní ionty spektra byly získány z nástríku roztoku voda/acetonitril (1/1, v/v) s napětím - 10 a - 15 V, při nástríkové teplotě 40 °C (Tab. 5) [5].

Tabulka 5 Hmotnostní spektra s elektrospejovou ionizací [5]

	m/z (MH^+)	m/z (M^-)	Kalkulovaná hmota	Sumární vzorec
BOX A	179,20	-	179,08	$C_9H_{11}N_2O_2$
BOX B	179,08		179,08	$C_9H_{11}N_2O_2$
MVM	-	135,9	-	$C_7H_7NO_2$

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie

Acetonitril	p.a.	Lach:Ner (ČR)
Bilirubin IX- α	-	Frontier Scientific (USA)
Butyl-acetát	95,5 %	Sigma-Aldrich (USA)
Dimethylsulphoxide Hybri-Max	p.a.	Sigma-Aldrich (Německo)
Glutaraldehyd (25 %)	p.a.	Penta (ČR)
Hank's BSS (1 \times)		
(Bez Ca a Mg, s Phenol Red)	-	PAA (Německo)
Hemin	-	Frontier Scientific (USA)
Hemoglobin lidský (lyofilizovaný)	-	ÚKBLD
Hydroxid sodný	čistý	Penta (ČR)
Chloroform	99,5 %	Sigma-Aldrich (USA)
Kyselina fosforečná (85 %)	p.a.	Sigma-Aldrich (USA)
Kyselina octová (90 %)	p.a.	Lach:Ner (ČR)
Kyselina mravenčí	96,0 %	Sigma-Aldrich (USA)
MEM Non Essential Amino		
Acids (100 \times)	-	PAA (Německo)
Minimum Essential Medium Eagle	-	Sigma-Aldrich (Německo)
Nutrient Mixture F-12 Ham	-	Sigma-Aldrich (Německo)
Peroxid vodíku (30 %)	p.a.	Lach:Ner (ČR)
Síran hořečnatý	čistý	Lach:Ner (ČR)
Síran železnatý, heptahydrát	čistý	Lach:Ner (ČR)
Trypan Blue stain 0,4 %	p.a.	Invitrogen (USA)

2.2 Použité přístroje

Vzorky byly váženy pomocí analytických vah ABT 220-4M (Kern, Německo). K přípravě vzorků byla použita vakuová odparka Laborota 4000 WB (Heidolph, Německo), vodní lázeň U4 (Miw, Rusko), míchačka Color Squid (Ika, Německo), vortex ZX3 (Velp Scientifica, Rakousko) a vakuová sušárna SPT 200 (Protech, Rusko). K radioaktivní přípravě volných radikálů byl použit přístroj GammaCell 220 (AECL, Kanada).

K proměření UV/VIS spekter studovaných látek byl použit UV/VIS spektrometr Lambda 20 (Perkin Elmer, USA), fluorescenční spektra byla měřena pomocí spektrofluorimetru LS 55 (Perkin Elmer, USA).

K podrobným studiím fyzikálně-chemických vlastností studovaných analytů byl použit kapalinový chromatograf skládající se z vysokotlaké pumpy Chrom sds 150 (Agilent, USA) s UV detektorem UV Smartline 2500 (Knauer, Německo), dávkovací ventil Rheodyne Dual Mode Injector 7725i, Grace Discovery Sciences, USA) se smyčkou 20 μ l a mikrostřikačka 1702 RN SYR (Hamilton, USA). Bylo pracováno při teplotě 22 ± 2 °C. Ke sběru a vyhodnocení dat byly použity programy Clarity (DataApex, ČR) a Origin-8 (OriginLab Corporation, USA).

Separace byly provedeny na koloně Gemini 3 μ m C6-Phenyl 110 Å, 150 \times 4,6 mm s předkolonou 0,5 μ m, 4 \times 3 mm z téhož materiálu (Phenomenex, USA).

Hmotnostní spektra vzorků z jednotlivých frakcí z HPLC byla analyzována pomocí hmotnostního spektrometru TSQ 7000 s trojitým kvadrupólem (Thermo Scientific, Německo). Hmotnostní spektra vzorků byla měřena na LC-MS přístroji, který se skládá z HPLC Agilent 1200 Series s detektorem diodového pole (DAD) (Agilent Technologies, USA), které bylo zapojeno v tandemu s hmotnostním spektrometrem Triple quad 6460 (Agilent Technologies, USA).

In vitro experimenty byly prováděny v laboratoři tkáňových kultur za přísně sterilních podmínek. Při rozpěstování buněk z konzerv byla použita centrifuga TJ-6 (Beckman, USA). Buňky byly pěstovány v CO₂ boxu Diurect Heat CO₂ incubator (Thermo Scientific, Francie). Média byla inkubována ve vodní lázni ST 402 (Nüve, Německo). Buňky byly počítány pomocí automatického počítadla buněk Cellometer

Auto T4 (Nexcelom Bioscience, USA), veškeré experimenty na buňkách byly prováděny v laminárním boxu Flow box EN-12469 (Merci, ČR).

Všechny *in vitro* experimenty byly prováděny v 96ti wellch (Orange Scientific, Belgie) a vyhodnocovány pomocí ELISA Readeru Sunrise (Tecan, Rakousko) za pomoci programu Magelan-6 (Tecan, Rakousko).

Statistika byla provedena pomocí programu Sigma Stat (Systat Software, USA).

2.3 Postupy

Z důvodů nestability nekonjugovaného bilirubinu a všech jeho derivátů a izomerů bylo nutno pracovat pod tlumeným světlem a všechny nádoby používané ke všem postupům a přípravám byly obalovány alobalem. Kvůli utajenému bodu varu směsí během zahřívání roztoků je nutné používat skleněnou tyčinku nebo varné kamínky.

2.3.1 Příprava purifikovaného bilirubinu IX- α

Komerčně dostupný bilirubin se vyrábí z hovězích žlučových kamenů a je znečištěný řadou látek (např. fosfolipidy, proteiny), které ve vzorku zůstávají během výrobního procesu. K jejich odstranění se používá purifikační metoda navržená McDonaghem a Assissim (1972) [115].

Sto miligramů UCB bylo rozpuštěno ve 180 ml chloroformu v Erlenmayerově baňce (250 ml) a směs byla zahřívána na vodní lázni až do bodu varu chloroformu (cca 61 °C) a roztok byl vařen 5 min. Roztok bilirubinu se nechal ochladit na laboratorní teplotu a byl zfiltrován přes navlhčený filtrační papír. Získaný filtrát byl rovnoměrně rozdělen do 6-ti suchých skleněných falkon a opakovaně promyt asi jedním objemem destilované vody (1 ×), roztoku 0,1 M NaHCO₃ (2 ×), 10 % roztoku NaCl (1 ×) a na závěr destilovanou vodou (4 ×).

Při každém promytí byly skleněné falkony důkladně (cca 50 ×) protřepány a po ustálení roztoku a rozdělení na dvě fáze se vždy vrchní fáze obsahující fosfolipidy a proteiny odsála. UCB zůstával po celou dobu promývání ve spodní, chloroformové fázi (žluté zbarvení).

Promytá chloroformová fáze s UCB byla na závěr skleněnou pipetou přenesena do čistých, suchých falkon (vždy obsah dvou falkon sloučen do jedné nové). Celkem

byly připraveny 3 falkony obsahující přečištěný chloroformový extrakt. Do každé falkony bylo přidáno malé množství síranu sodného na odstranění zbytků vody. Falkony byly protřepány a následně centrifugovány 5 minut při 1800 rpm.

Žlutý chloroformový supernatant obsahující UCB byl přefiltrován přes navlhčený filtrační papír do čisté Erlenmayerovy baňky (250 ml). Získaný filtrát byl zahříván na vodní lázni do bodu varu chloroformu a poté na této teplotě udržován až do okamžiku, kdy se na stěnách baňky začal srážet UCB, poté byl do roztoku za stálého míchání přidán asi 1 ml methanolu, tím vznikl výrazně oranžový zákal. Do směsi bylo napipetováno dalších 15 ml methanolu a směs se nechala ochladit na laboratorní teplotu.

Po vychladnutí byl roztok centrifugován 5 min při 1800 rpm, byl odstraněn supernatant a vzniklá oranžová sraženina UCB byla $2 \times$ promyta 15 ml methanolu. Získaný oranžový UCB byl přepipetován do čisté předem zvážené zkumavky s víčkem. Kvůli úplnému dosušení byl UCB lyofilizován přes noc. Druhý den byl vzorek zvážen a uskladněn v exikátoru v lednici. Výťažnost této purifikační metody je asi 80 % [115].

2.4 Postupy přípravy oxidačních produktů bilirubinu

2.4.1 Metoda přípravy BOXů a MVM podle Kranc et al. [5]

Příprava BOXů vycházela z metody Krance a spolupracovníků [5]. Sto miligramů směsi izomerů bilirubinu bylo rozpuštěno ve 25 ml 5 M NaOH v Erlenmayerově baňce zabalené v alobalu a mícháno za laboratorní teploty 4 hodiny. Během 4 hodin změnila směs zbarvení z oranžové na temně zelenou. Roztok byl neutralizován 11,3 ml 11 M HCl na pH = 7,4 a ochlazen na ledové lázni. K reakční směsi bylo poté přidáno 20 ml 30% peroxidu vodíku a reakční směs byla ponechána ve tmě 48 hodin za laboratorní teploty.

Po uplynutí reakční doby došlo ke změně zbarvení z temně zelené na světle žlutou barvu. Surová směs byla podtlakově filtrována přes teflonový filtr (0,2 μ m). Filtrát byl poté extrahován $10 \times$ chloroformem, extrakční poměr 5:1 (v/v) filtrát:chloroform.

Extrakt byl dosušen síranem sodným a přefiltrován přes filtrační papír. Vzniklý filtrát byl odpařen po částech na vakuové odparce. Vznikly žluté krystalky, které byly uloženy v argonové atmosféře do mrazáku (-32 °C). Výtěžek takto připravených BOXů byl shodný s dostupnou literaturou, tedy okolo 4 % [5].

2.4.2 Modifikovaná metoda přípravy BOXů

Na základě dostupné literatury jsme vyzkoušeli s pomocí Ing. Jaroslava Zelenky, PhD. (Fyziologický ústav AV ČR) vlastní modifikaci metody přípravy BOXů.

Metodu dle Kranc et al. jsme modifikovali následujícím způsobem. Jeden miligram purifikovaného UCB byl zcela rozpuštěn v 10 ml 0,2 M NaOH. K této směsi byl přidán 1 ml 30% roztoku peroxidu vodíku a 0,5 mg síranu železnatého a směs se nechala zreagovat v temnu po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Reakce byla ukončena přidávkem 10 ml 0,1 M kyseliny fosforečné.

Samotné BOXy z reakční směsi byly získány dvěma různými způsoby extrakce:

A) Do butylacetátu

Připravený roztok byl extrahován 3×8 ml butylacetátu. Všechny butylacetátové fáze byly spojeny a extrakt byl zakoncentrován na vodní lázni při 60 °C pod proudem argonu na objem 1 ml.

B) Do chloroformu

Místo butylacetátu byl použit chloroform. Chloroformové frakce byly zpipetovány a odpařeny pomocí vakuové odparky na objem 1 ml.

2.4.3 Metoda přípravy BOXů radioaktivním ozařováním

Velmi zajímavým způsobem přípravy BOXů se zdál být postup použitý v metodě ozařování melatoninu dle [116]. Příprava vzorků byla provedena ve spolupráci s Doc. Ing. Václavem Čubou, Ph.D (Katedra jaderné chemie ČVUT, ČR). Deset miligramů purifikovaného UCB bylo rozpuštěno ve 20 ml 0,2 M hydroxidu sodného a vloženo do ozařovací cely GammaCell na 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby ozáření byla reakční směs zneutralizována pomocí 20 ml 0,1 M kyseliny fosforečné.

Neutralizovaný roztok byl extrahován do butylacetátu (viz výše).

2.4.4 Extrakce BOXů z heminu

Pro ověření vzniku BOXů z heminu byl 1 mg této látky rozpuštěn pomocí vortexu a ultrazvuku v 10 ml 0,2 M hydroxidu sodného. Pro spuštění reakce byl k roztoku přidán 1 ml 30% peroxidu vodíku. Díky přítomným iontům železa došlo k bouřlivé reakci (Fentonova reakce). Směs reagovala 30 min za laboratorní teploty v temné místnosti,

poté byla zneutralizována 10 ml 0,1 M kyseliny fosforečné a extrahována do butylacetátu (viz výše).

2.4.5 Extrakce BOXů z hemoglobinu

Na závěr byl vyzkoušen i postup vzniku BOXů z hemoglobinu. Lidský lyofilizovaný hemoglobin (109 mg) byl rozpuštěn v 10 ml 0,2 M hydroxidu sodného a k roztoku byl přidán 1 ml 30% peroxidu vodíku. Reakční směs byla ponechána za laboratorní teploty v temné místnosti 30 minut. Po uplynutí inkubační doby byla směs zneutralizována 10 ml 0,1 M kyseliny fosforečné. U dna falkony vznikala tuhá směs.

Směs se nechala zcentrifugovat (10 min, 3000 rpm). Supernatant se zfiltraval pomocí injekční stříkačky přes vat, následovala ještě vakuová filtrace přes teflonový filtrační papír (0,2 μ m). Vzniklý filtrát byl extrahován do butylacetátu (viz výše).

2.5 Analýza BOXů

2.5.1 HPLC

K analýze vzniklých BOXů byla použita metoda HPLC. Byly testovány různé podmínky stanovení v závislosti na typu přípravy BOXů, v následujícím oddíle je přehledný seznam jednotlivých postupů přípravy. Byly analyzovány jednotlivé vzorky BOXů připravených metodou dle Kranc et al. [5], modifikovanou metodou, radioaktivním ozařování v GammaCellu, extrakcí z hemoglobinu a extrakcí z heminu.

Vzniklý roztok BOXů v 1 ml chloroformu či butyl-acetátu byl nastříkovan (20 μ l) na kolonu Gemini C6-phenyl (Phenomenex, USA) s předkolonkou, jako MF byl

použit 15 a 30% vodný roztok acetonitrilu. Průtok byl nastaven v rozmezí 0,5 - 0,8 ml/min dle typu analýzy a vlnová délka byla nastavena na hodnotu 305 nm. Před analýzou byla kolona 30 minut promývána 30 % vodným roztokem acetonitrilu.

2.5.2 Analýza BOXů pomocí hmotnostní spektrometrie

2.5.2.1 Analýza BOXů pomocí MS z najímaných frakcí z HPLC

K provedení MS analýzy BOXů byly zvlášť najímány všechny frakce, které byly detekovatelné HPLC (BOX-A a BOX-B), poté byla provedena MS analýza jednotlivých sloučenin na tandemovém hmotnostním spektrometru TSQ-7000 s trojitým kvadrupólem (Thermo Scientific, Německo) s použitím elektrosprejové ionizace.

2.5.2.2 Analýza BOXů pomocí HPLC/MS s trojitým kvadrupólem

Byla provedena separace a následná analýza BOXů pomocí přístroje skládajícího se z HPLC Agilent 1200 series (Agilent Technologies, USA), které bylo zapojeno v tandemu s hmotnostním spektrometrem Triple quad 6460 (Agilent Technologies, USA). Jako separační kolona byla použita kolona Gemini C6-phenyl (Phenomenex, USA) s předkolonkou. Jako MF byl použit 30% vodný roztok acetonitrilu s přídavkem 0,2 % (v/v) kyseliny mravenčí kvůli lepší ionizaci vzorku. Analýza hmoty byla nastavena na rozmezí 100 – 500 m/z, fragmentační napětí bylo nastaveno na hodnotu 85 V a sušící teplota byla 350 °C. Tyto analýzy byly provedeny ve spolupráci s Mgr. Petrem Kozlíkem (Katedra analytické chemie, PřF UK v Praze)

2.5.3 Fluorescenční emisní spektra BOXů

Směs BOXů a MVM byla rozpuštěna v deionizované vodě na koncentraci 1 mg/ml a byla stanovena excitační a emisní spektra na spektrofluorimetru LS 55 (Perkin Elmer, USA). Nejprve bylo proměřeno excitační spektrum studovaného vzorku. Ze získaných dat byla odvozena excitační vlnová délka $\lambda = 300$ nm a byla změřena emisní spektra směsi BOXů a MVM.

2.6 Stabilitní studie BOXů

2.6.1 Stanovení časové stability BOXů v butylacetátovém roztoku

BOXy byly připraveny modifikovanou metodou. Butyl-acetátový extrakt byl odpařením pod argonem zkoncentrován na 1 ml. Z tohoto vzorku BOXů bylo v časových intervalech (0; 18; 30 min; 19; 21; 29; 46; 58; 68 a 153 hod) analyzováno vždy 20 µl vzorku pomocí HPLC, aby byla zjištěna časová stabilita vzorku.

2.6.2 Stanovení teplotní stability BOXů v butylacetátovém roztoku

BOXy byly připraveny modifikovanou metodou. Butyl-acetátový extrakt byl odpařením pod argonem zkoncentrován na 1 ml. Byly připraveny alikvoty BOXů (100 µl) a ty byly temperovány vždy 1 hodinu při různých teplotách (-32; 5; 25; 37; 50 a 100 °C). Poté bylo analyzováno vždy 20 µl vzorku pomocí HPLC, aby byl zjištěn vliv teploty na stabilitu BOXů.

2.7 *In vitro* experimenty

Dostupná literatura uvádí, že BOXy vznikají především v mozku. Pro studium jejich *in vitro* účinků byla proto zvolena buněčná linie lidského neuroblastomu SH-SY5Y používaná jako buněčný model pro studium metabolismu nervových buněk [117].

Všechny *in vitro* experimenty byly prováděny za přísných sterilních podmínek v laboratořích tkáňových kultur.

2.7.1 Příprava kultivačního média

Do 500 ml plastové sterilní láhve bylo sterilně napipetováno 212,5 ml média Nutrient Mixture F-12 Ham; 212,5 ml média Minimum Essential Medium Eagle; 5 ml směsi antibiotik: Penicillin-Streptomycin; 5 ml koncentrovaného roztoku Glutamaxu; 5 ml zásobního roztoku Non Essential Amino Acids Solution a 75 ml hovězího séra (FBS) Foetal Bovine Serum.

2.7.2 Příprava roztoku trypsinu

K uvolnění buněk přisedlých v kultivační lahvi se používá roztok trypsinu, který se připraví 10ti násobným zředěním zásobního roztoku trypsinu s promývacím roztokem Hanks.

2.7.3 Pasážování buněk

Všechny dostupné buněčné linie se uchovávají v kryovialkách pod tekutým dusíkem. Před začátkem experimentů je vždy nutné rozpěstovat si novou konzervu buněk. Kryovialka s buněčnou suspenzí se nechá rychle rozmrazit (37 °C), její obsah se sterilně přepipetuje do 15 ml falkony, přidá se 12 ml média a stočí (5 min, 500 rpm). Supernatant se sterilně odsaje a k peletě buněk se přidá 5 ml média, směs se opatrně propipetuje a přenese do čisté 25 cm² kultivační láhve. Druhý den po rozpěstování nové konzervy se doporučuje výměna média za čerstvé kvůli odstranění zbytku dimethylsulfoxidu, který je v konzervách.

Pasážování buněk bylo prováděno kvůli jejich množení a uchování v linii. Správný okamžik pasážování byl určen vizualizací misek pod mikroskopem. Miska by měla být porostlá z 70 – 80 %, neuroblastomové buňky dosáhly této konfluence zhruba 1 × za týden. Z misky bylo sterilně odsáto médium. Promývacím roztokem byly opláchnuty z buněk zbytky média (na 25 cm² misku použijeme 3 ml Hanks). Promývací roztok Hanks byl opatrně sterilně odsát a k buňkám byl přidán trypsin (u 25 cm² misky 1 ml) k rozvolnění buněk. Účinek trypsinu byl inaktivován přidavkem média (u 25 cm² misky 1,5 ml média), buněčnou suspenzí bylo potřeba několikrát (cca 20 ×) propipetovat, aby se rozvolnily větší shluky buněk a poté byla přenesena část buněčné suspenze do nové lahve s čerstvým médiem.

2.7.4 Příprava buněk na experimenty

Pro *in vitro* experimenty byly použity buňky ve 4. a vyšší pasáži dosahující alespoň 80 % konfluence.

Postup přípravy buněk pro experiment je obdobný postupu při pasážování. Po promytí a trypsinizaci buněk opět následuje inaktivace médiem. Buněčná suspenze byla řádně propipetována, kvůli rozbití shluků (suspenze nesměla pěnit) a přepipetován celý objem ze všech misek do jedné falkony. Počet buněk se stanovuje pomocí počítadla buněk. Deset mikrolitrů buněčné suspenze se smíchá s 10 μ l Trypan Blue stain 0,4 % (Invitrogen), zlehka zvortexuje a deset mikrolitrů obarvené buněčné suspenze je přeneseno na sklíčko s počítací komůrkou. Sklíčko je vloženo do počítadla buněk a přístroj spočítá celkový počet buněk, počet buněk živých a mrtvých a celkovou viabilitu. Ze zadaných parametrů přístroj dopočítá, v jakém poměru je nutno naředit buněčnou suspenzi médiem pro experiment.

Všechny experimenty byly prováděny v 96ti-wellech a výsledná koncentrace viabilních buněk byla vždy 4×10^5 buněk/ml suspenze. Do každé jamky wellu bylo vždy napipetováno 100 μ l suspenze. Buňky byly vždy ponechány 24 hodin v CO₂ inkubátoru, aby si „sedly“ a poté byly buňky připraveny k experimentům. Po této inkubaci bylo médium nahrazeno roztokem studovaných látek v médiu (působkem). Předmětem pokusu bylo studium vlivu různých koncentrací BOXů na neuroblastomové buňky. Inkubační doba buněk s působky byla vždy 24 hodin. Jako kontroly se používaly působky o různé koncentraci UCB, působky obsahující hemin a čisté médium bez přídavku působků.

2.7.5 Studium viability buněk

Pro studium viability buněk byl použit MTT test jehož principem je obarvení viabilních buněk a následná spektrofotometrická detekce, která je přímo-úměrná koncentraci přeživších buněk. Základem stanovení bylo barvení buněk Triazolyl blue tetrazolium bromidem. Po uplynutí doby inkubace buněk s působkem byl celý zbytek působku odsát a k buňkám bylo přidáno 50 μ l roztoku thiazolyl blue tetrazolium bromide, rozpuštěného v médiu, $c = 1$ mg/ml, a inkubováno 2 hodiny v termostatu (37 °C), poté byl roztok MTT opatrně odpipetován a k buňkám bylo přidáno 100 μ l DMSO (dimethylsulfoxid). Destička byla ponechána třepat 10 min při 100 rpm. Viabilita buněk byla stanovena při 540 nm pomocí ELISA Readru Sunrise (Tecan, Rakousko) s vyhodnocovacím softwarem Magelan-6 (Tecan, Rakousko).

2.7.6 Studium buněčné proliferace

Běžně používanou metodou pro studium buněčné proliferace je test s krystalovou violetí, jehož principem je obarvení proliferujících buněk a následná spektrofotometrická detekce, která je přímo-úměrná koncentraci proliferujících se buněk. Po uplynutí doby inkubace bylo do každé jamky přidáno 5 μ l 23% glutaraldehydu kvůli fixaci buněk, poté byla ponechána destička třepat 15 minut při 350 rpm. Veškerá buněčná suspenze s glutaraldehydem byla poté slita a destička byla 3 \times promyta destilovanou vodou a usušena.

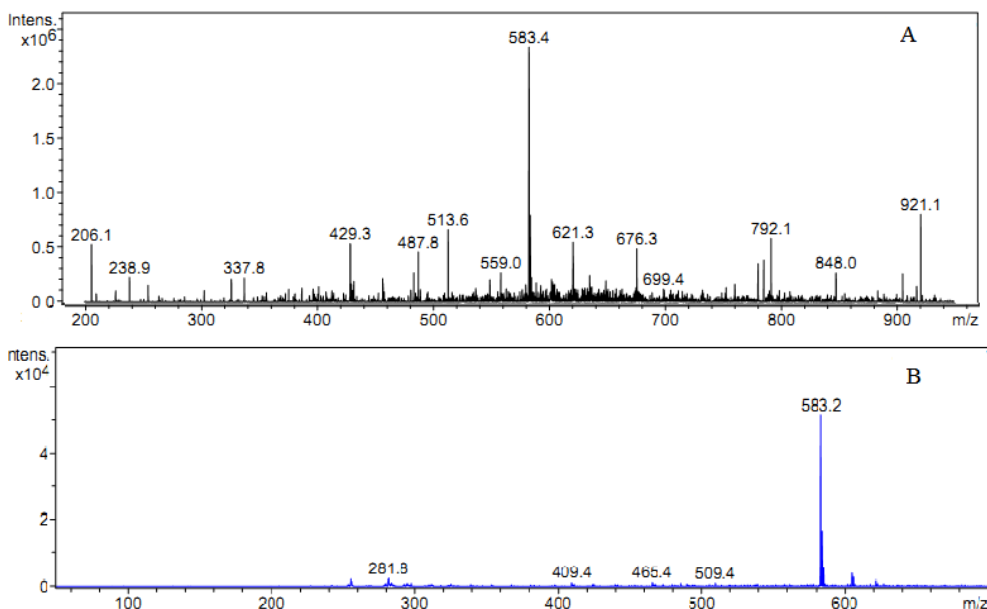
K zafixovaným buňkám bylo přidáno 100 μ l 0,1% roztok krystalové violeti ve vodě (kvůli odbarvení buněk) a destička byla ponechána třepat dalších 20 minut při 350 rpm. Na závěr byl roztok krystalové violeti slit, destička byla opět propláchnuta 3 \times destilovanou vodou a usušena. K buňkám bylo přidáno 100 μ l 10% kyseliny octové a byla měřena absorbance při 590 nm pomocí ELISA Readru Sunrise (Tecan, Rakousko) s vyhodnocovacím softwarem Magelan-6 (Tecan, Rakousko).

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Purifikace bilirubinu IX- α

Kvůli eliminaci vlivů nečistot přítomných v komerčním bilirubinu bylo nutné si jej přečistit. Čistota purifikovaného bilirubinu byla vždy ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie ve spolupráci s RNDr. Martinem Štíchou, (Katedra organické chemie PřF UK), byl použit MS analyzátor iontová past, negativní mód a napětí na výstupu bylo – 106,7 V.

Pro lepší představu jsou na obr.14 uvedeny MS záznamy těchto stanovení, hmota 583,4 odpovídá molekulovému iontu bilirubinu. Po porovnání MS spektra na obrázku 14 A s obrázkem 14 B je patrné, že purifikovaný bilirubin (obr. 14 B) je mnohem čistší než bilirubin bez purifikace (obr. 14 A).



Obr. 14 Hmotnostní spektra bilirubinu (negativní mód, napětí na výstupu: - 106,7 V) A) před purifikací, B) po purifikaci

Závěr:

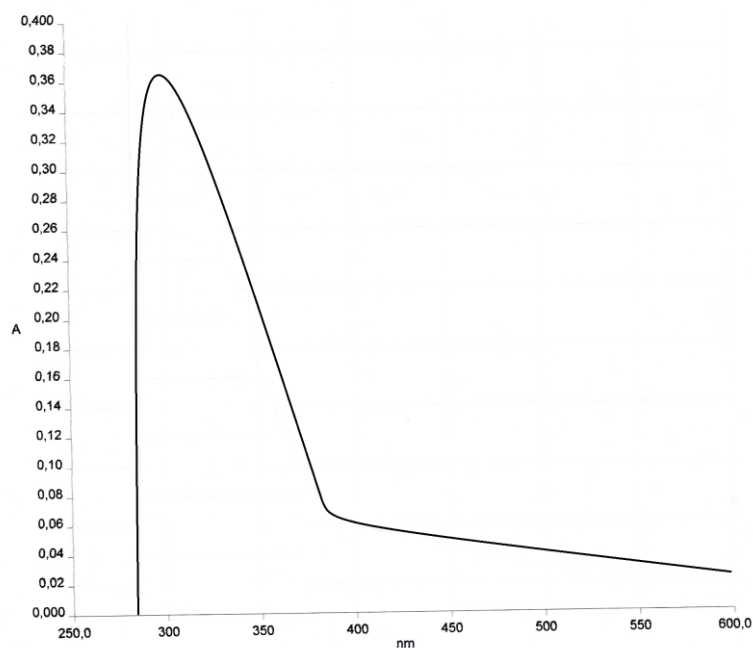
Na základě dat uvedených v literatuře byla vyzkoušena purifikace komerčně dostupného bilirubinu a pomocí hmotnostní spektrometrie byl ověřen rozdíl mezi purifikovaným a nepurifikovaným bilirubinem. Čistota purifikovaného bilirubinu byla v porovnání s nepurifikovaným vyšší, proto byl pro všechny další experimenty používán pouze

bilirubin purifikovaný. Proces purifikace úspěšně odstraňuje většinu fosfolipidů, proteinů a ostatních nežádoucích biologických látek, které se nacházejí v komerčně dodávaném bilirubinu a mohly by ovlivňovat výsledky provedených experimentů.

3.2 Stanovení BOXů

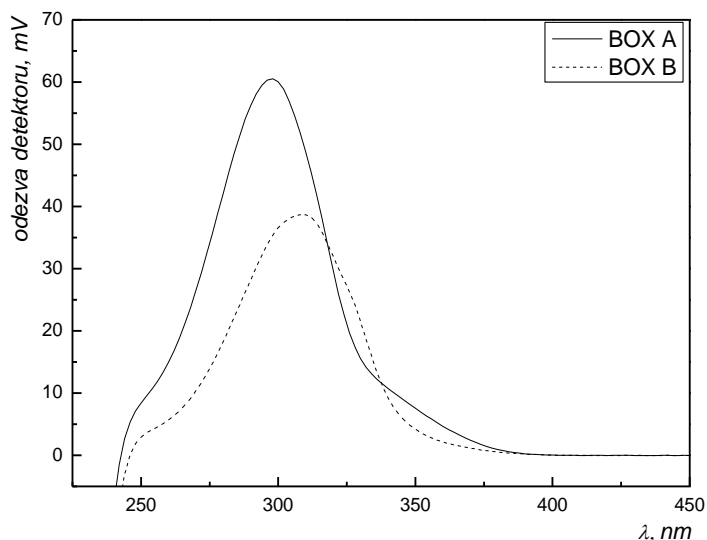
3.2.1 UV/VIS spektrometrie BOXů

Dle postupů uvedených v oddíle 2.4 byly připraveny oxidační produkty bilirubinu. Pro jejich podrobnější studium bylo nutno ověřit jejich absorpční maximum, proto byla stanovena UV/VIS spektra připravených analytů dle metody Kranc et al. Směs BOXů byla rozpuštěna ve vodě a její spektrum bylo měřeno pomocí spektrofotometru Lambda 20 (Perkin Elmer, USA). Absorpční maximum studované směsi bylo dle naměřených dat stanoveno na 305 nm, obr. 15, což koresponduje s dostupnou literaturou.



Obr. 15 Absorpční maximum směsi BOXů (ve vodě)

Pomocí následných HPLC analýz ve spojení s DAD detektorem byly stanoveny absorpční maxima obou BOXů. BOX A měl absorpční maximum 298 nm, BOX B 309 nm. Srovnání absorpčních maxim obou studovaných analytů je uvedeno na obrázku 16.



Obr. 16 Absorpční maxima jednotlivých BOXů

Plnou čarou je znázorněna křivka pro BOX A s maximem v 298 nm a přerušovanou čarou je znázorněna křivka pro BOX B v 305 nm.

Závěr:

Porovnáním uvedených UV/VIS spekter s daty uvedenými v literatuře jsme zjistili, že absorpční maxima pro jednotlivé analyty jsou 298 nm pro BOX-A a 309 nm pro BOX B. Pro detekci v průběhu HPLC analýz studované směsi analytů byla jako vhodná délka navržena vlnová délka $\lambda = 305$ nm.

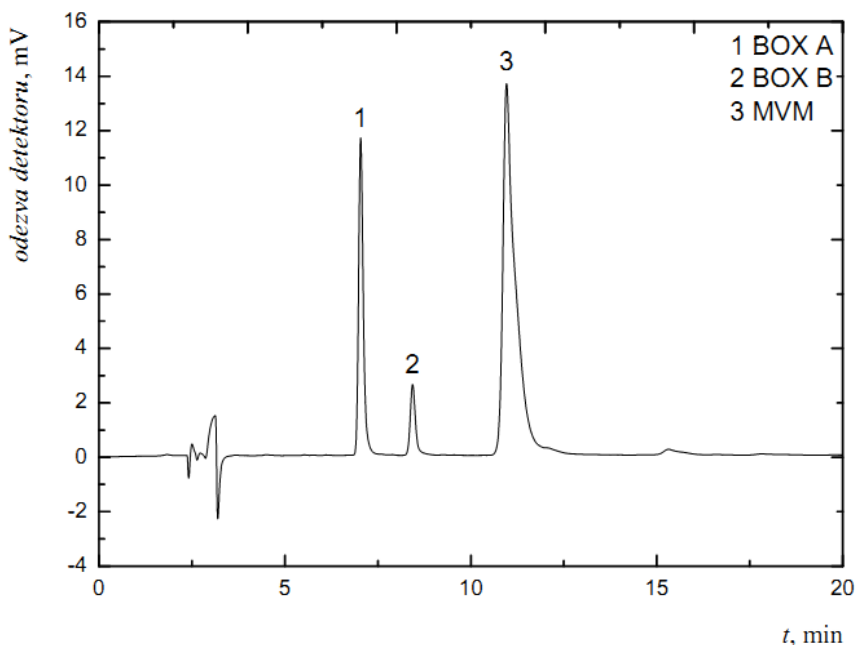
3.2.2 HPLC analýza připravených BOXů

Separaci směsi analytů připravených oxidací bilirubinu, heminu a hemoglobinu výše uvedenými postupy byla provedena za použití SF C6-phenyl Gemini (Phenomenex, USA) a reverzního separačního módu. Všechny eluce byly izokratické. Před zahájením každé analýzy byla kolona vždy promyta po dobu 30 min 30% acetonitrilem. Acetonitril, jako organická složka mobilní fáze, byl vybrán na základě dat dostupných v literatuře [6].

3.2.2.1 BOXy připravené podle metody Kranc et al. [5]

Podle výše uvedeného postupu byly připraveny oxidační produkty bilirubinu. Vznikaly žluté krystalky, které se rozpouštěly pro HPLC analýzy v butylacetátu na výslednou koncentraci 1 mg/ml. Na obrázku 17 je chromatogram separace analytů připravených dle Kranc et al., 2000. Porovnáním retenčních časů s literaturou byl pík s retenčním časem 7,0 min identifikován jako BOX A a pík eluující v čase 8,4 min jako BOX B. V retenčním čase 11,0 min pak eluoval MVM.

Výtěžek izolace směsi analytů pomocí této metody byl okolo 4 %.



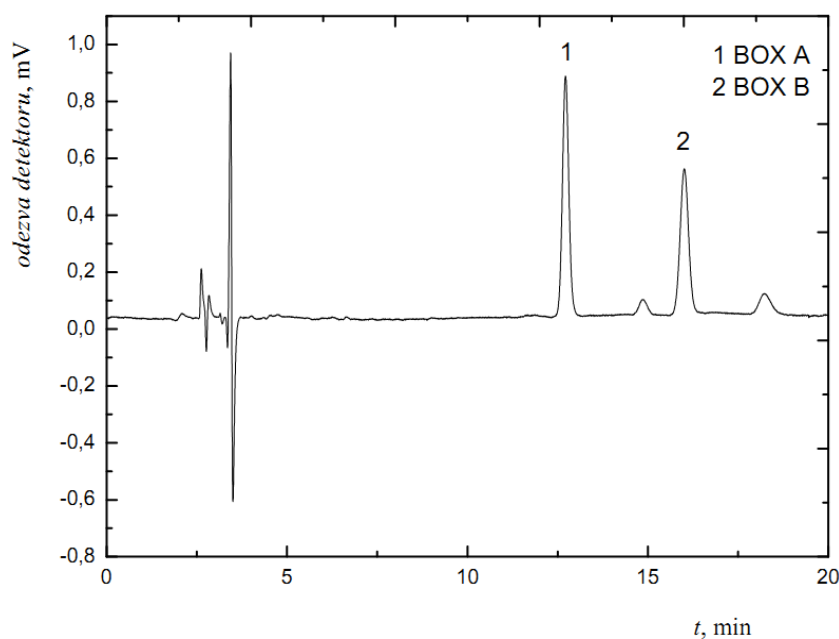
Obr. 17 HPLC chromatogram jednotlivých BOXů připravených metodou dle Kranc et al. MF 30 % ACN, $F_m = 0,8$ ml/min, detekce $\lambda = 305$ nm, $T = 25$ °C

3.2.2.2 BOXy připravené modifikovanou metodou

Pro zjednodušení postupu a zkrácení délky přípravy analytů byla navržena modifikovaná metoda oxidace bilirubinu. Analyty byly v závěrečné fázi přípravy extrahovány do dvou rozdílných rozpouštědel a separovány pomocí HPLC.

A) Separace BOXů připravených extrakcí do butylacetátu

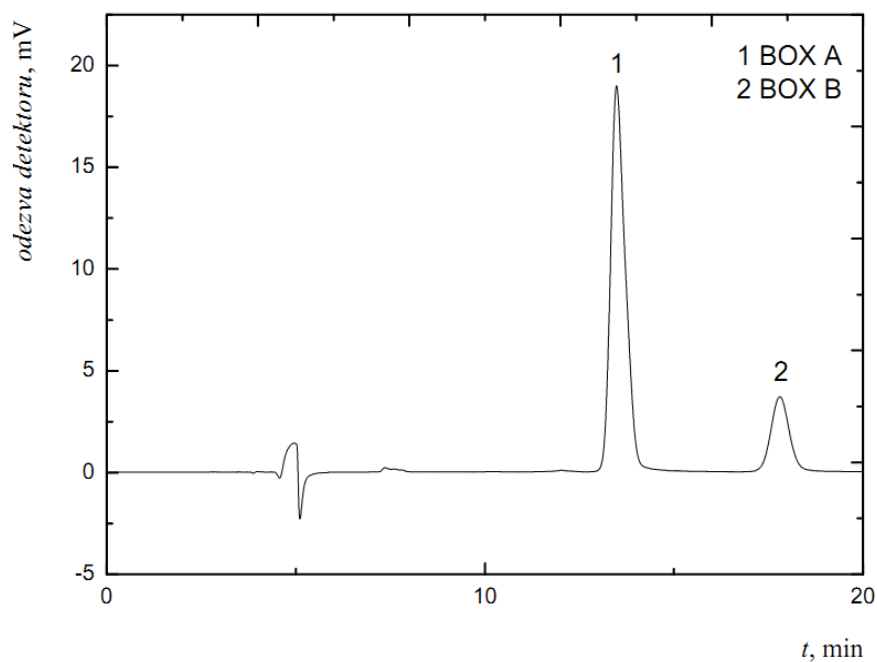
Nejprve byla zkoušena extrakce BOXů do butylacetátu. Směs se nesměla nechat odpařit úplně do sucha, aby bylo možné studované analyty stanovit, úplným odpařením totiž došlo k těsnému přilnutí analytů na dno používané nádoby a nebylo možno je znova převést do roztoku. Na obrázku 18 je zobrazen chromatogram separace BOXů připravených touto modifikovanou metodou. Látky byly opět identifikovány porovnáním jejich retenčních časů a s literaturou byly určeny jako BOX A (analyt v čase 12,7 min) a BOX B (s retenčním časem 16,0 min).



Obr. 18 HPLC chromatogram jednotlivých BOXů připravených modifikovanou metodou s extrakcí do butyl-acetátu. MF 30 % ACN, $F_m = 0,5$ ml/min, detekce $\lambda = 305$ nm, $T = 25$ °C

B) Separace BOXů připravených extrakcí do chloroformu

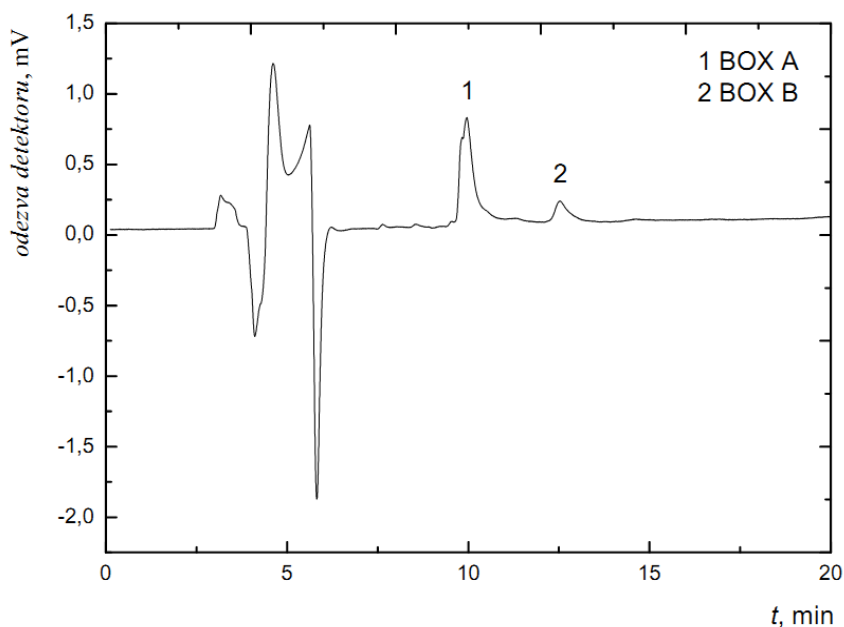
Jako další postup byla vyzkoušena extrakce připravených analytů do chloroformu, aby byl eliminován vliv butylacetátu a bylo možno zkusit i úplné odpaření rozpouštědla bez rozkladu a ztráty izolovaných analytů. Na chromatogramu znázorněném na obrázku 19 lze najít opět oba studované analyty – BOX A ($t_R = 13,5$ min), BOX B ($t_R = 17,8$ min).



Obr. 19 HPLC chromatogram jednotlivých BOXů připravených modifikovanou metodou s extrakcí do chloroformu. MF 30 % ACN, $F_m = 0,5$ ml/min, detekce $\lambda = 305$ nm, $T = 25$ °C

3.3 Separace analytů připravených radioaktivním ozařováním

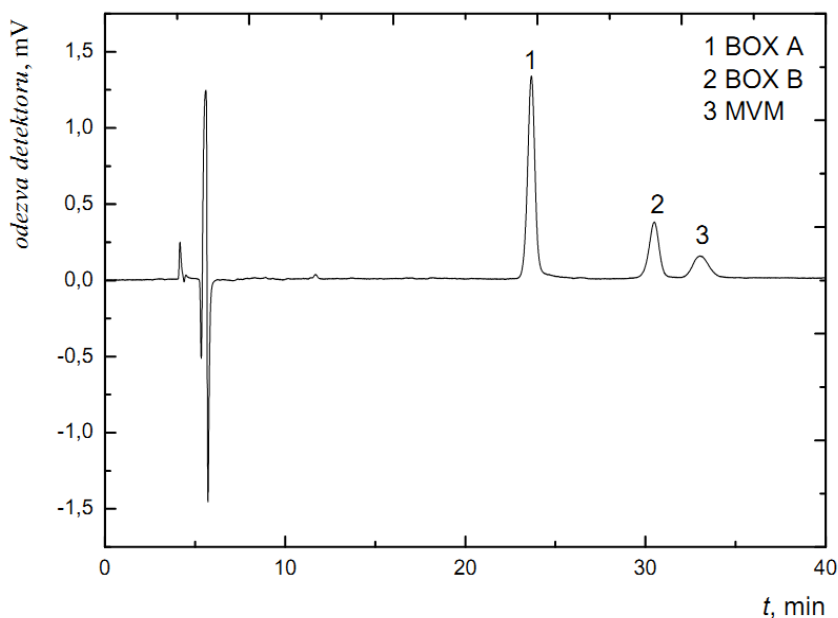
Radiolýzou vody, jako rozpouštědla, vzniká velké množství radiolytických produktů. Stabilními produkty radiolýzy vody jsou H_2 , H_2O_2 a v podstatně menších množstvích se tvoří též O_2 . V průběhu chemického stádia radiolýzy dochází ke tvorbě vysoce reaktivních radikálových produktů, jako jsou solvatovaný elektron, hydroxylový radikál, vodíkový radikál a další. Všechny tyto reaktivní produkty a meziprodukty radiolýzy vody vytváří silné oxidační prostředí pro vznik oxidačních produktů bilirubinu. Tímto postupem by bylo možné věrně simulovat vznik BOXů v experimentech *in vivo*. Záznam získaný analýzou vzorku připraveného tímto postupem je na obrázku 20. Analyt s $t_R = 10,0$ min byl identifikován jako BOX A a retenční čas $t_R = 12,5$ min v čase 12,5 min byl přiřazen BOXu B.



Obr. 20 HPLC chromatogram jednotlivých BOXů připravených pomocí radioaktivního ozařování s extrakcí do butylacetátu. MF 30 % ACN, $F_m = 0,5$ ml/min, detekce $\lambda = 305$ nm, $T = 25$ °C

3.4 Separace analytů připravených oxidací heminu

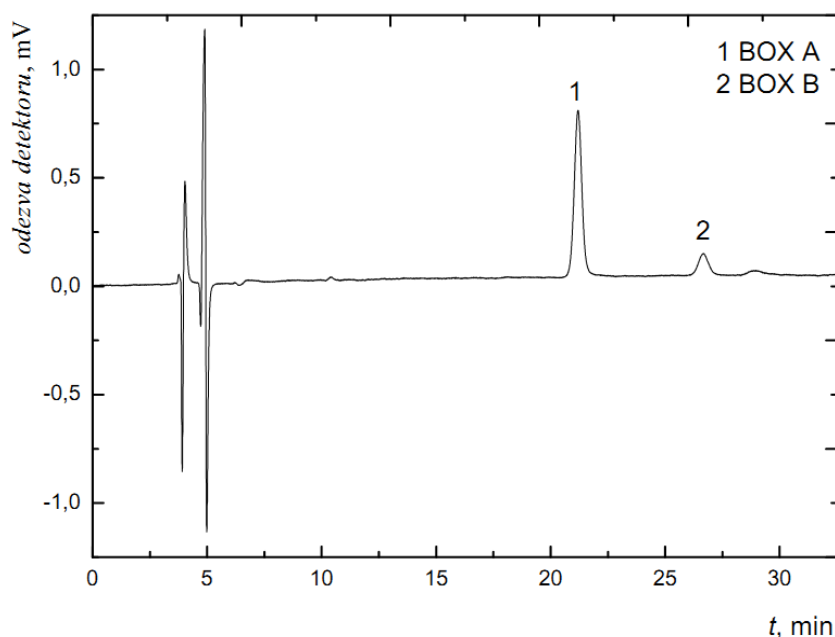
V některých publikacích se uvádí, že BOXy vznikají pouze z bilirubinu přímou reakcí s oxidačními agens. V následujícím experimentu jsme se pokusili zjistit, zda by oxidační produkty bilirubinu mohly vzniknout přímo oxidací z hemu. Byl použit hemin, což je komerčně dostupný derivát hemu. Pro separaci směsi připravené tímto postupem bylo upraveno složení MF (bylo sníženo množství organické složky fáze), tím došlo k časovému posunu eluce všech studovaných analytů a to tak, že v čase 23,7 min eluoval BOX A, v čase 30,5 min BOX B a v čase 32,9 min MVM, jak je vidět na obr. 21.



Obr. 21 HPLC chromatogram jednotlivých BOXů připravených oxidací z heminu s extrakcí do butylacetátu. MF 15 % ACN, $F_m = 0,5$ ml/min, detekce $\lambda = 305$ nm, $T = 25$ °C

3.5 Separace analytů připravených z hemoglobinu

Protože bylo zjištěno, že oxidační produkty lze připravit přímo z heminu, stejně jako bilirubinu, byl postup přípravy BOXů vyzkoušen také z lidského hemoglobinu. Záznam separace BOXů připravených z tohoto substrátu je uveden na obrázku 22. Opět byla použita MF s nižším objemem organické složky fáze a retenční čas 21,2 min byl přiřazen BOXu A, retenční čas 26,7 min BOXu B. MVM při postupu přípravy oxidačních produktů z hemoglobinu nevznikal.



Obr. 22 HPLC chromatogram jednotlivých BOXů připravených z lidského hemoglobinu s extrakcí do butylacetátu. MF 15 % ACN, $F_m = 0,5$ ml/min, detekce $\lambda = 305$ nm, $T = 25$ °C

Závěr:

Díky výsledkům získaných z HPLC analýz lze říci, že nejšetrnějším postupem přípravy oxidačních produktů je ozáření vzorků v GammaCellu, kde je eliminován vliv vysoké koncentrace peroxidu vodíku, avšak vzhledem k množství vzorku potřebného pro další analýzy byla tato metoda vyloučena jako příliš finančně a časově náročná.

Námi navržená modifikovaná metoda přípravy BOXů také nebyla příliš vhodná a to zejména kvůli nízké výtěžnosti a přítomnosti butylacetátu, který nebyl vhodný pro

další účely studia oxidačních produktů.

Na základě provedených experimentů se podařilo zjistit, že oxidační produkty bilirubinu vznikají i z heminu a hemoglobinu, což by mohlo být důležité pro další studium biologických účinků oxidačních produktů.

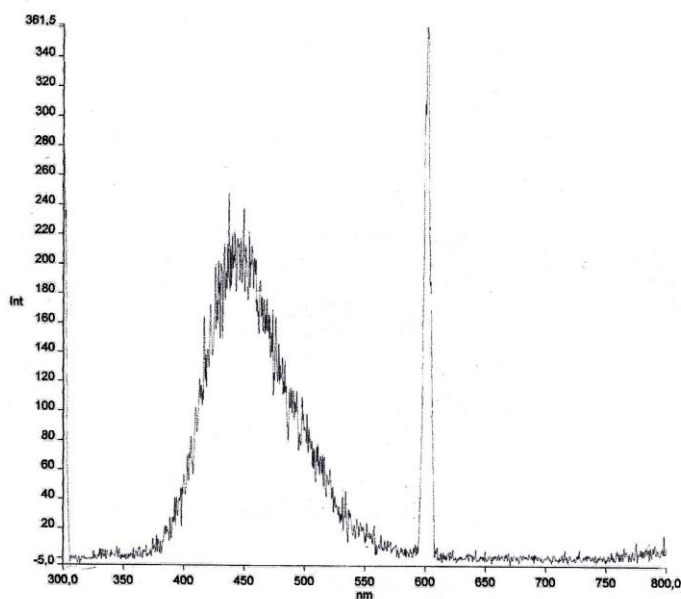
Jako optimální a nejefektivnější postup přípravy oxidačních produktů bilirubinu byla vyhodnocena metoda dle Kranc et al., 2000 [5]. BOXy připravované touto metodou byly použity pro všechny další analýzy a studie uvedené v této diplomové práci.

3.6 Fluorescenční analýza BOXů

V dostupné literatuře není žádná zmínka o fluorescenčních vlastnostech BOXů. Jelikož výchozí látka, bilirubin, vykazuje fluorescenci, byly studovány fluorescenční vlastnosti oxidačních produktů. Směs BOXů o koncentraci 0,5 mg/ml ve vodě byla proměřena na fluorescenčním spektrometru LS 55.

Nejprve bylo proměřováno excitační spektrum, které mělo ve výsledném spektru dvě hlavní maxima při 246 nm a 330 nm.

Dále bylo proměřováno emisní spektrum BOXů pro stejný vzorek při excitaci vzorku vlnovou délkou 300 nm. Pro toto emisní spektrum byly změřeny dvě izolovaná emisní maxima při vlnové délce 437 nm a 601 nm (Obr. 23).



Obr. 23 Emisní spektrum BOXů (ve vodě)

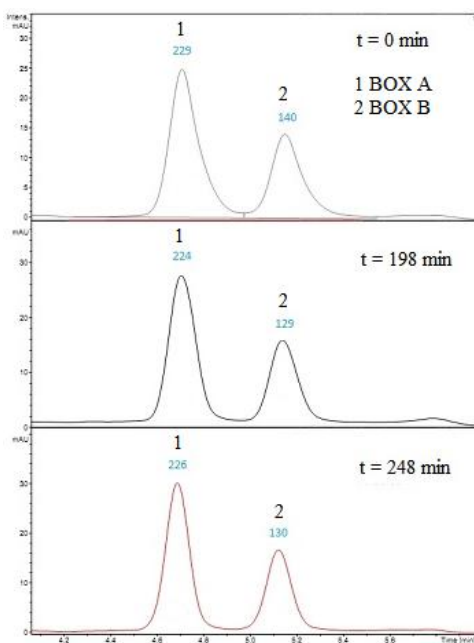
3.7 Stabilitní studie BOXů

Literatura týkající se BOXů uvádí značnou nestabilitu těchto analytů, proto jsme se rozhodli tuto informaci ověřit. Byly provedeny dvě stabilitní studie - studie stability analytů na čase a na teplotě.

3.7.1 Časová stabilita BOXů

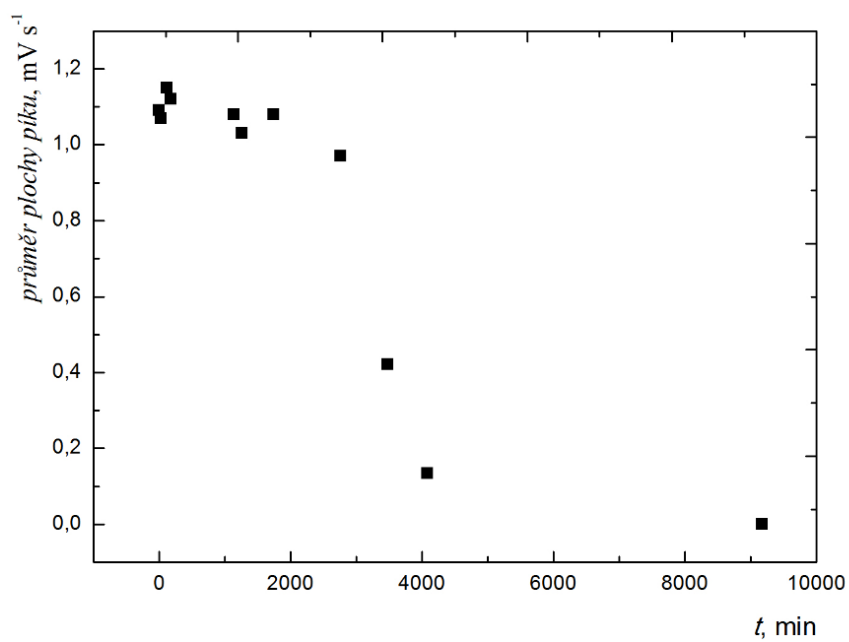
Časová stabilita BOXů byla stanovována pomocí HPLC v různých časových intervalech: 0; 18; 30 min; 19; 21; 29; 46; 58; 68 a 151 hod). Mezi jednotlivými analýzami byl vzorek uchovávan v temnu při laboratorní teplotě.

Dostupné publikace uvádějí, že BOXy jsou stabilní pouze několik minut a poločas jejich rozkladu je kolem 10 hod. Podle námi naměřených dat (obr. 24) je patrné, že studované BOXy jsou mnohem stabilnější. Plochy píků se v časovém intervalu 0 - 4 hod prakticky neměnily, tudíž v tomto intervalu jednoznačně nedochází degradaci studovaných analytů.



Obr. 24 Časová stabilita BOXů

Časové intervaly 0, 198 a 248 min, MF 30 % ACN, $F_m = 0,7$ ml/min, detekce $\lambda = 305$ nm, $T = 25$ °C

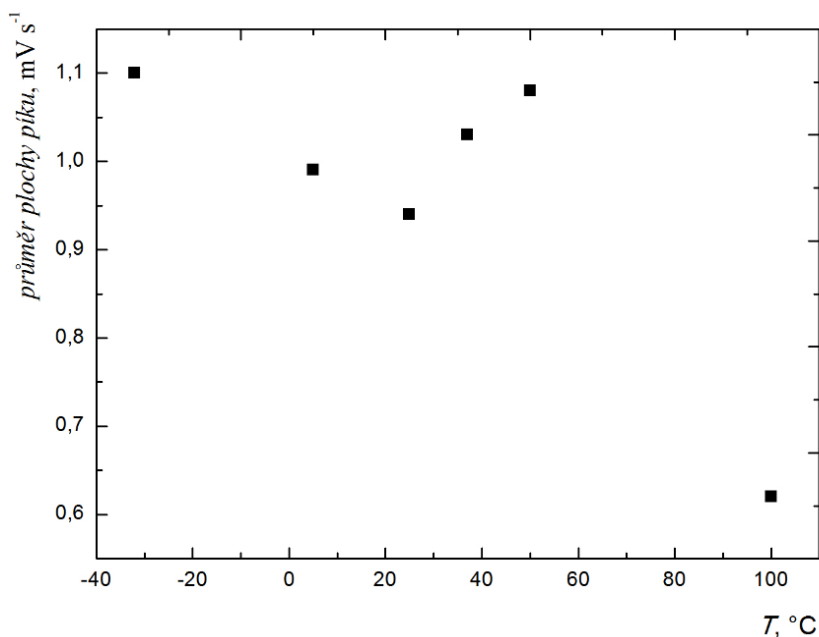


Obr. 25 Závislost průměru plochy píku analytů na čase

Na obrázku 25 je znázorněno celé studované časové spektrum, díky kterému jsme schopni říci, že BOXy jsou za podmínek skladování při laboratorní teplotě velmi stabilní. K úplnému rozpadu studovaných analytů v roztoku dochází zhruba 153 hodin od jejich přípravy, k poklesu jejich množství na polovinu dochází až někdy okolo 3000 min od přípravy. Tato informace je velmi důležitá pro plánování dalších možných experimentů s těmito látkami.

3.7.2 Teplotní stabilita BOXů

Teplotní stabilita BOXů byla stanovována pomocí HPLC. Směs analytů byla rozpuštěna v butyl-acetátu a inkubována po dobu 1 hodiny za různých teplotních podmínek -32; 5; 25; 37; 50 a 100 °C. Ihned po ukončení inkubace byly vzorky analyzovány. Bylo zjištěno, že BOXy jsou stabilní v teplotní rozmezí od -32 °C do 50 °C (Obr. 26), což je stěžejní pro případné experimenty *in vitro* a *in vivo*. Při teplotě 100 °C dochází k teplotní degradaci BOXů.



Obr. 26 Závislost průměru plochy píku analytů na teplotě

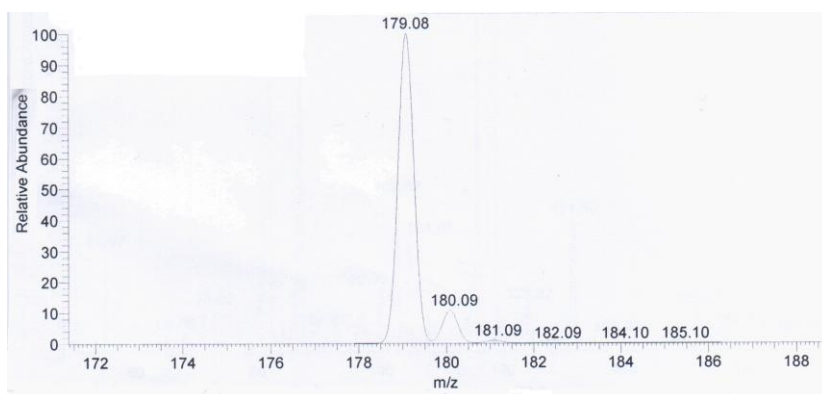
Závěr:

Z uvedených výsledků lze soudit, že na rozdíl od dříve publikovaných dat, jsou námi připravované oxidační produkty bilirubinu výrazně stabilnější, a to jak v časovém horizontu, tak v horizontu teplotním. Toto zjištění je důležitým faktorem pro plánování *in vitro* experimentů a další možné pokusy s BOXy.

3.8 Analýza BOXů pomocí hmotnostní spektrometrie

3.8.1 Analýza BOXů pomocí MS z najímaných frakcí z HPLC

První experiment s MS analýzami BOXů byl proveden ve spolupráci s Doc. RNDr. Janou Roithovou, Ph.D. (Katedra organické chemie PŘF UK v Praze). Analýza byla provedena na hmotnostním spektrometru TSQ 7000 s trojitým kvadrupólem (Thermo Scientific, Německo). Díky tomuto experimentu byla potvrzena předpokládaná hmota (m/z) = 179 v záporném módu ionizace (obr. 27). Hmoty stanovené pomocí kladného módu byly pro BOX A 180,1 a BOX B 181,2.



Obr. 27 Hmotnostní spektrum odpovídající BOXu A, fragmentační napětí = 85 V, sušící teplota na kapiláře $T = 350\text{ }^{\circ}\text{C}$

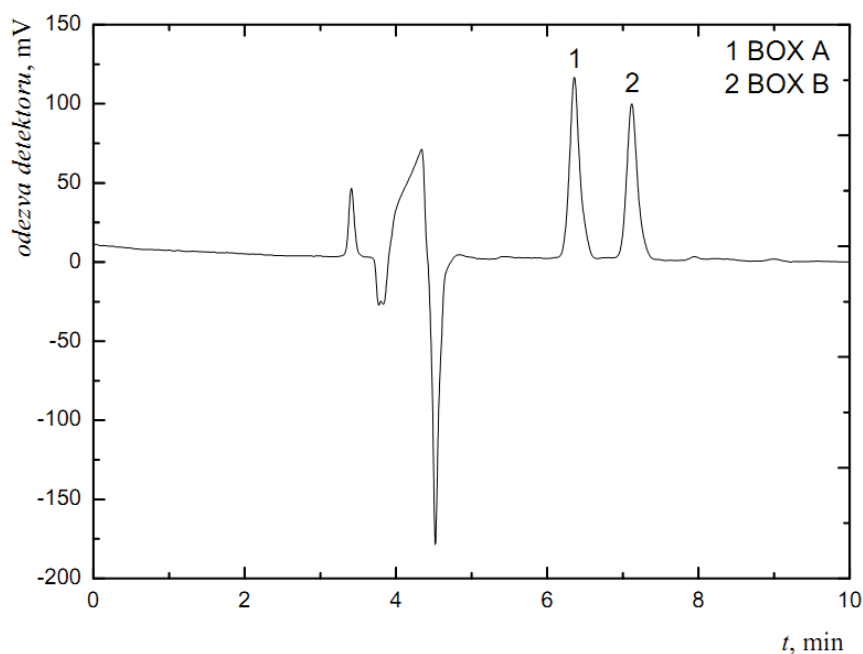
3.8.2 Analýza BOXů pomocí LC/MS

Pro finální verifikaci jednotlivých analytů byla navržena HPLC metoda spojením s MS, která byla modifikací HPLC metody výše používané. Pro lepší ionizaci studovaných vzorků byla MF obohacena o kyselinu mravenčí běžně pro tyto účely používanou. Ve spolupráci s Mgr. Petrem Kozlíkem (Katedra analytické chemie, PŘF UK v Praze) byla tato analýza provedena na hmotnostním analyzátoru Triple quad 6460 (Agilent Technologies, USA).

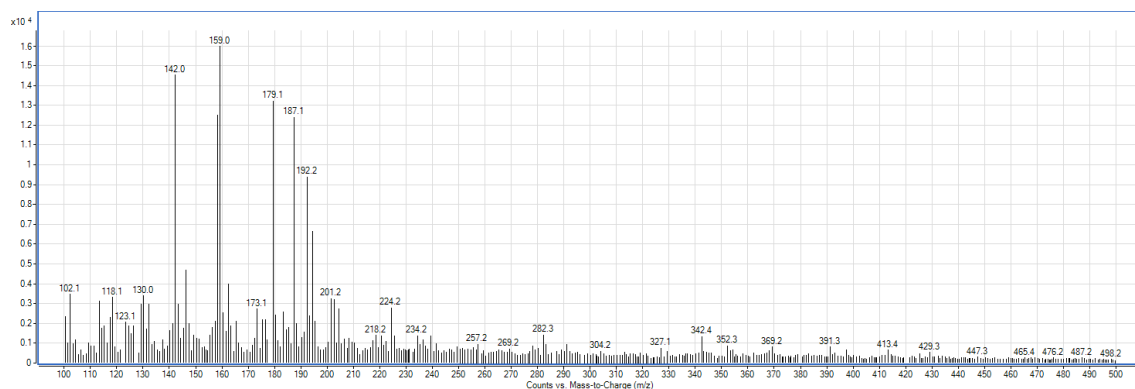
Výsledek seprace BOXů pomocí LC/MS je znázorněn na obrázku 28. Na obrázcích 29 a 30 jsou pak výsledné záznamy pro BOX A a BOX B.

Obrázek 29 znázorňuje hmotnostní spektrum náležící píku s retenčním časem 6,4 min. Hmota tohoto píku odpovídá $m/z = 179$, což se shoduje s hmotnostním spektrem pro BOX A. Obrázek 30 představuje hmotnostní spektrum píku s retenčním

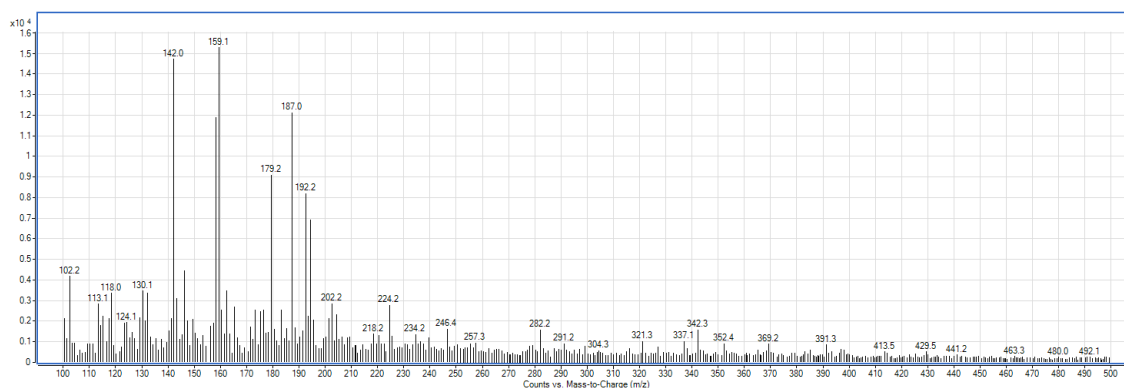
časem 7,1 min, kde lze opět pozorovat vysoké zastoupení hmoty $m/z = 179$. Tento pík byl podle dostupných dat identifikován, jako BOX B. Ostatní hmotnostní píky pravděpodobně přísluší nečistotám z použitého rozpouštědla, případně degradačním produktům vznikajícím při oxidační reakci bilirubinu, která se extrakčním postupem nepodařilo odstranit.



Obr. 28 Separace směsi analytů pomocí LC/MS. MF 30 % ACN + 0,02 % kyselina mravenčí, $F_m = 0,5$ ml/min, detekce $\lambda = 305$ nm, $T = 25$ °C



Obr. 29 Hmotnostní spektrum BOXu A. $t_R = 6,4$ min, fragmentační napětí = 85 V, sušící teplota na kapiláře $T = 350$ °C



Obr. 30 Hmotnostní spektrum BOXu B. $t_R = 6,4$ min, fragmentační napětí = 85 V, sušící teplota na kapiláře $T = 350$ °C

Závěr:

Pro ujištění, že vyizolované studované analyty jsou opravdu oxidačními produkty bilirubinu, byla použita metoda hmotnostní spektrometrie. Nejprve byla použita MS analýza v offline módu – byly najímány frakce BOXu A i BOXu B a nastříknuty přímo na MS, získaná spektra odpovídala publikovaným datům. Následně byla vyzkoušena i online MS analýza ve spojení s kapalinovou chromatografií. Hmotnostní spektra obou píků izolovaných analytů ($m/z = 179$) odpovídala hmotnostním spektrům BOXů.

3.9 *In vitro* experimenty

Po studiu fyzikálně-chemických vlastností oxidačních produktů bilirubinu jsme se zaměřili na jejich biologické účinky. V dostupné literatuře se uvádí, že BOXy (BOX A a BOX B) se vyskytují v mozkomíšním moku pacientů po subarachnoidálním krvácení, proto byla jako model ke studiu jejich biologických účinků *in vitro* použita neuroblastomová buněčná linie SH-SY5Y.

3.9.1 Spektrofotometrická analýza rozpustnosti BOXů ve fosfátovém pufru

Aby bylo s buňkami pracováno za podmínek fyziologického pH, bylo nutno vysledovat, jak se BOXy rozpouštějí ve fosfátovém pufru o různé hodnotě pH. Dle dat uvedených výše (obr. 15) byla nastavena hodnota absorpčního maxima na $\lambda = 305$ nm. Poté byly proměřovány roztoky BOXů ve fosfátovém pufru o různém pH (pH 7,0; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8 a 8,0). Jako blank byl použit vždy samotný fosfátový pufr o daném pH a byla odečítána hodnota absorbance v bodě absorpčního maxima rovného 305 nm (Tab. 6).

Z tabulky 6 je patrné, že nejvyšší absorbanci vykazovala směs BOXů rozpouštěných ve fosfátovém pufru o pH 7,2, avšak také hodnota absorbance BOXů rozpouštěných v roztoku o pH 7,4 byla velmi vysoká. Protože pH 7,4 je považováno za fyziologické pH v lidském těle, byl fosfátový pufr o tomto pH navržen, jako nejvhodnější roztok pro rozpouštění BOXů pro buněčné experimenty a budoucí *in vivo* aplikace.

Tabulka 6 Absorbance směsi BOXů ve fosfátovém pufru
o různých hodnotách pH pufru (roztok BOXů: c = 1 mg/ml)

pH (fosfátový pufr)	A _{305 nm}
7,0	0,737
7,2	0,907
7,4	0,876
7,6	0,590
7,8	0,984
8,0	0,688

Závěr:

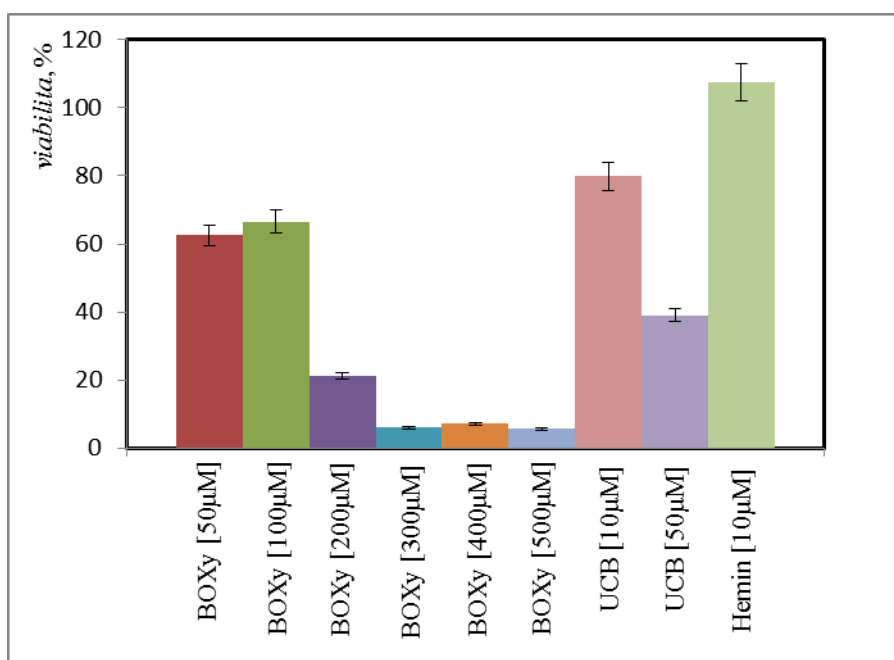
Po proměření roztoků BOXů ve fosfátových pufrech o různých pH (7,0 - 8,0) byla pozorována nejvyšší absorbance a rozpustnost této směsi v roztocích o pH 7,2 a 7,4. Protože je fosfátový pufr o pH 7,4 všeobecně považován za vhodný pufr k zjištění práce za fyziologických podmínek, byly pro další *in vitro* experimenty BOXy vždy rozpuštěny v pufru o tomto pH. Tato metoda není ovšem zcela relevantní, protože by mohlo docházet k neúplnému rozpuštění BOXů, což by mělo vliv na výslednou absorbanci BOXů. Metoda byla použita jako orientační.

3.9.2 Studium vlivu směsi BOXů, UCB a heminu na viabilitu buněk

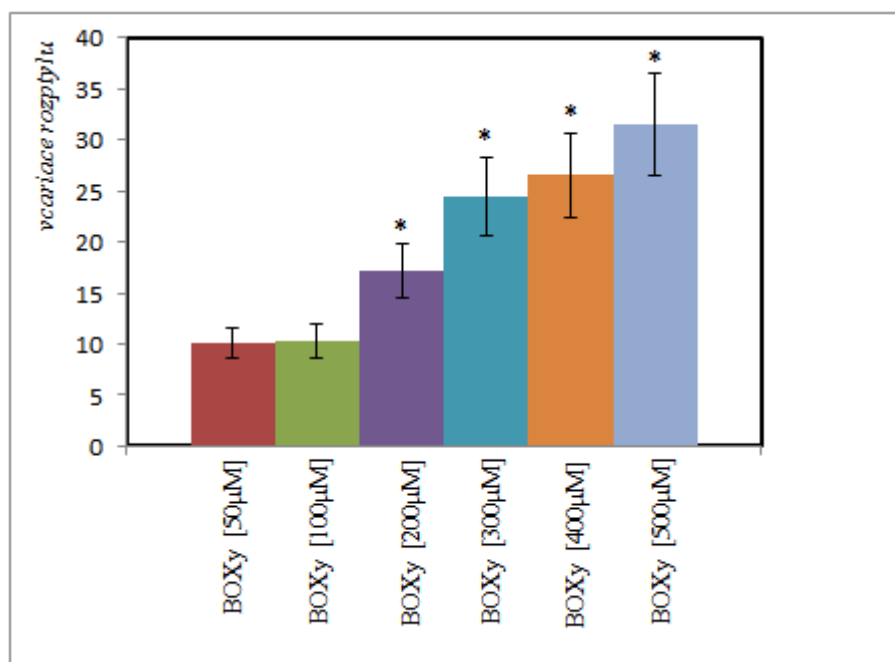
Jedním ze studovaných parametrů v rámci *in vitro* testů, bylo studium buněčné viability. Pro tyto pokusy byly buňky přeneseny do 96-ti wellů, koncentrace byla vypočítána pomocí počítadla buněk na 4×10^5 buněk/ml buněčné suspenze. Pracovalo se v pentapletech a to tak, že každý pentaplet byl ovlivněn jinou koncentrací směsi BOXů (rozpuštěných ve fosfátovém pufru pH 7,4). Použité působky byly připraveny tak, aby výsledná koncentrace BOXů v médiu byla 50; 100; 200; 300; 400 a 500 $\mu\text{mol/l}$). Jako kontroly byly použity buňky ovlivněné bilirubinem a heminem a buňky neovlivňované působky. Roztok UCB byl připraven v DMSO tak, aby celková koncentrace UCB v médiu byla 10 a 50 $\mu\text{mol/l}$ a koncentrace DMSO v médiu 0,6 %. Hemin jako kontrola byl také rozpuštěn v DMSO tak, aby byla jeho celková koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$ v médiu a koncentrace DMSO byla stejně jako u bilirubinu 0,6 % v médiu. Pro studium vlivu působků na buněčnou viabilitu byla navržena 24-hodinová inkubace, po které následovalo barvení buněk pomocí MTT.

Celkový profil ovlivnění buněčné viability všemi působky je uveden v obrázku 31 a dokazuje, že koncentrace směsi BOXů nižší než 200 $\mu\text{mol/l}$ snížila viabilitu buněk přibližně o 30 %, koncentrace BOXů 200 $\mu\text{mol/l}$ již znatelně viabilitu snižuje, a to více než o 50 %, a při koncentracích 300 $\mu\text{mol/l}$ a vyšších dochází ke zřetelné až totální inhibici viability buněk.

UCB o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ viabilitu buněk nijak neinhibuje, zatímco koncentrace UCB 50 $\mu\text{mol/l}$ jejich životaschopnost snižuje o více než polovinu. Studovaný roztok heminu (koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$) na buňky nemá vliv. Získaná data byla statisticky zpracována (obr. 32) a dáno do vztahu s buňkami kontrolními, neovlivněnými žádným působkem.



Obr. 31 Vliv BOXů, UCB a heminu na viabilitu buněk SH-SY5Y



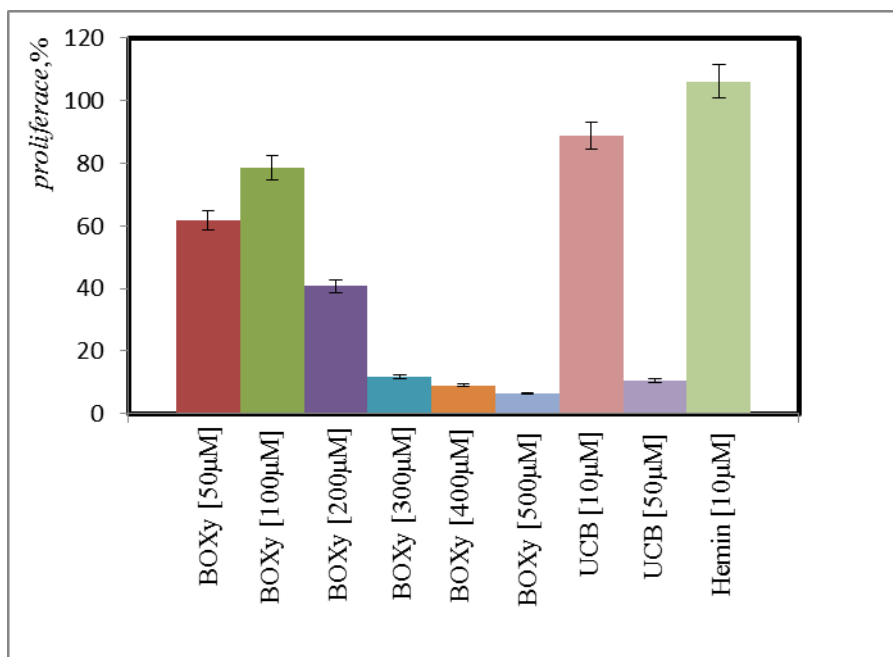
Obr. 32 Statistický graf viability buněk zpracovaný testem ANOVA vztážené ke kontrolnímu vzorku média s fosfátovým pufrém (Dannův test), * $P < 0,05$

3.9.3 Studium vlivu směsi BOXů, UCB a heminu na buněčnou proliferaci

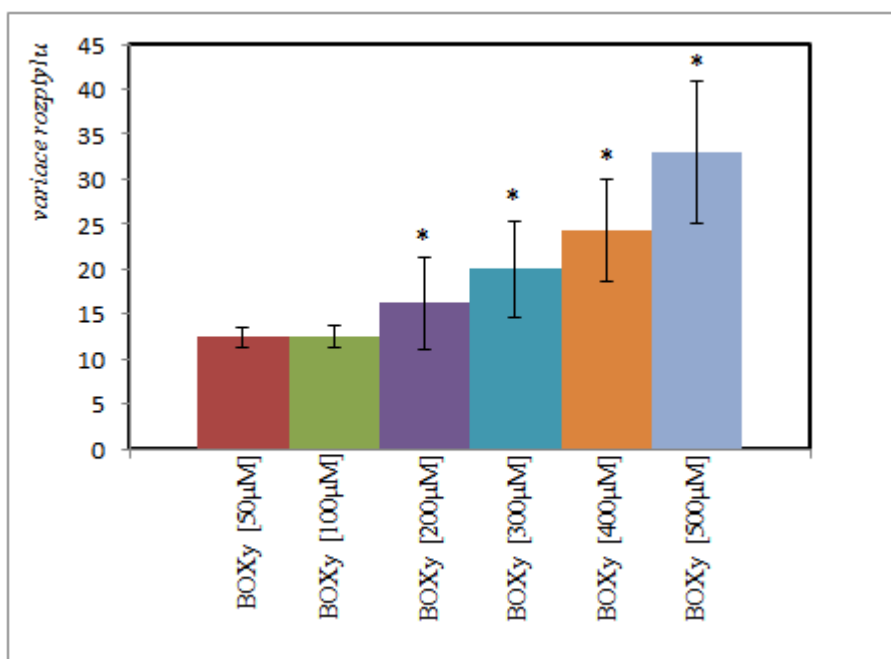
Paralelně se studiem viability buněk byly provedeny i experimenty zkoumající buněčnou proliferaci. Buňky byly opět vysety do 96-ti wellů, koncentrace 4×10^5 buněk/1 ml buněčné suspenze a ovlivňovány působky - různými koncentracemi směsi BOXů ($c = 50; 100; 200; 300; 400$ a $500 \mu\text{mol/l}$) v médiu, roztok UCB (v DMSO) o celkové koncentraci 10 a $50 \mu\text{mol/l}$, roztokem heminu (v DMSO) o celkové koncentraci $10 \mu\text{mol/l}$. Buňky ovlivňované UCB, heminem a buňky neovlivněné působky byly použity jako kontroly testu.

Po 24 hodinové inkubaci buněk s působky byly provedeny testy barvením krystalovou violetí, souhrn těchto výsledků je znázorněn v obrázku 33 a koreluje s výsledky studia buněčné viability, tudíž lze říci, že koncentrace směsi BOXů nižší než $200 \mu\text{mol/l}$ snížila proliferaci buněk přibližně o 30 %. Koncentrace $200 \mu\text{mol/l}$ výrazně snižuje buněčnou proliferaci, dokonce o více než 50 % ve srovnání s buňkami kontrolními a koncentrace BOXů $300 \mu\text{mol/l}$ a vyšší buněčnou proliferaci inhibují velmi výrazně nebo úplně.

Stejně jako tomu bylo u studia viability, ani buněčná proliferace není roztokem UCB o koncentraci $10 \mu\text{mol/l}$ ovlivněna. Při použití UCB o koncentraci $50 \mu\text{mol/l}$ však dochází ještě k výraznějšímu poklesu proliferace, než tomu bylo v případě snížení buněčné viability. Hemin o koncentraci $10 \mu\text{mol/l}$ neměl žádný efekt na proliferaci buněk. Získaná data byla statisticky zpracována (obr. 34) a dáno do vztahu s buňkami kontrolními, neovlivněnými žádným působkem.



Obr. 33 Vliv BOXů, UCB a heminu na viabilitu buněk SH-SY5Y



Obr. 34 Statistický graf proliferace buněk zpracovaný testem ANOVA vztažené ke kontrolnímu vzorku média s fosfátovým pufrém (Dannův test), * $P < 0,05$

Závěr:

Testy viability a buněčné proliferace jsou základní testy používané ke studiu biologických účinků neznámých nebo neocharakterizovaných látek. V případě této diplomové práce byly studovány biologické účinky směsi obsahující BOX A a BOX B na buněčné linii SH-SY5Y a tato data byla srovnávána s účinky bilirubinu a heminu na týchž buňkách.

Buňky byly vždy inkubovány po dobu 24 hodin s vybranými působky o různých koncentracích a poté byly provedeny již zmíněné testy sledující vliv látek na buněčnou viabilitu (MTT test) a proliferaci (test pomocí krystalové violeti). Dle získaných dat lze říci, že všechny použité působky ovlivňovaly buněčnou viabilitu i proliferaci více méně stejnou měrou, a to tak, že koncentrace směsi BOXů o koncentraci vyšší však měli již cytotoxické účinky. Kontrolní roztoky heminu a UCB o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ neměly vliv na buněčnou proliferaci či viabilitu, roztok UCB o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ inhiboval buněčnou proliferaci i viabilitu, a to o více než polovinu v porovnání s kontrolními buňkami.

Výsledky testů vlivu BOXů na proliferaci a viabilitu buněk jsou velice překvapivé, hlavně při srovnání s koncentračním ovlivnění buněk bilirubinem. Z výsledků vyplývá, že BOXy jsou pro buňky méně škodlivé než samotný bilirubin.

4 ZÁVĚR

První část diplomové práce se věnovala optimalizaci metody přípravy BOXů a MVM z purifikovaného nekonjugovaného bilirubinu. Určení vhodného postupu této přípravy bylo stěžejním předpokladem pro úspěšné provedení dalších experimentů, které měly za cíl studium fyzikálně-chemických vlastností a biologických účinků studovaných analytů. Po vyzkoušení řady postupů byla jako nejvhodnější metoda přípravy BOXů a MVM vybrána modifikovaná metoda podle profesora Krance [5], kterou lze získat nejvyšší množství studovaných analytů v porovnání s metodami ostatními.

V průběhu hledání ideální metody byly vyzkoušeny i postupy přípravy BOXů a MVM za pomoci radioaktivního ozařování na přístroji GammaCell, či příprava z lidského lyofilizovaného hemoglobinu a z heminu.

Stěžejní analytickou technikou k výzkumu fyzikálně-chemických vlastností a separacím směsi BOXů a MVM byla vysokotlaká kapalinová chromatografie. Optimálních podmínek separace směsi analytů bylo dosaženo použitím analytické kolony C-6 phenyl (Phenomenex) jako stacionární fáze a 15% vodného roztoku acetonitrilu jako fáze mobilní (průtok 0,7 ml/min), vlnová délka byla nastavena na 305 nm.

K zjištění vlnového absorpčního maxima vhodného k detekci analytů byly použity metody spektrofotometrické, díky nimž bylo zjištěno, že směs studovaných analytů má absorpční maximum 305 nm. Pomocí DAD detektoru byly pak stanoveny vlnová maxima pro BOX A (298 nm) a BOX B (309 nm). Absorpční maximum pro MVM nebylo stanoveno.

Pro bližší charakterizaci BOXů A a B bylo též použito hmotnostní spektrometrie. Nejprve v offline provedení za použití hmotnostního spektrometru, který disponoval ionizací elektrosprejem a trojitým kvadrupólovým analyzátozem. Při práci v záporném módu byly naměřeny hmoty m/z pro BOX A 179 a pro BOX B 179, hmoty stanovené pomocí kladného módu byly pro BOX A 180,1 a BOX B 181,2. Všechna data se shodovala s hodnotami uvedenými v dostupné literatuře. Pro určení hmot BOXů bylo použito i metody LC/MS. HPLC podmínky byly převzaty z metody používané k separaci směsi analytů, s drobnou úpravou v mobilní fázi (obohacení kyselinou mravenčí kvůli ionizaci), hmotnostní spektrometr se skládal z elektrospreje a trojitého

kvadrupólového analyzátoru. I toto spojení chromatografické a hmotnostní metody potvrdilo hmoty uváděné v literatuře a získané z offline analýzy.

Z hlediska plánování dalších experimentů bylo nutno verifikovat i data týkající se stability studovaných analytů. Literatura uvádí vysokou nestabilitu BOXů, avšak díky provedeným stabilitním studiím v rámci této práce, bylo zjištěno, že při uchovávání BOXů v roztoku butylacetátu v temnu při laboratorní teplotě, jsou analyty vysoce stabilní a jejich pozvolná degradace byla pozorována až po 46 hodinách od rozpuštění, k jejich úplnému rozpadu pak došlo až po 153 hodinách. Důležité bylo i ověření stability teplotní, byla studována v rozsahu teplot $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ až po $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, připravené roztoky byly vždy inkubovány po danou dobu jedné hodiny na danou teplotu. Rozmezí teplot od $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ nijak během inkubační doby neovlivnilo složení ani množství analytů ve zkoumané směsi, při teplotě $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ došlo k výraznému rozpadu BOXů.

Kvůli přípravě BOXů pro *in vitro* experimenty bylo nutné určit vhodné pH roztoku pro jejich rozpouštění. Pro studium jejich biologických účinků byl vybrán fosfátový pufr a byl zkoumán vliv jeho pH (v rozmezí 7,0 - 8,0) na rozpustnost směsi BOXů. Ze získaných dat byl vybrán jako optimální pufr o pH 7,4.

Součástí této diplomové práce bylo i naplánování a provedení *in vitro* experimentů, které by osvětlily biologické účinky směsi BOXů. Jako vhodný model pro toto studium byly vybrány lidské neuroblastomové buňky SH-SY5Y a zjišťoval se vliv roztoku BOXů, UCB a heminu na jejich viabilitu a proliferaci, což jsou základní parametry testování toxicity látek. Z výsledků provedených experimentů bylo zjištěno, že směs BOXů v koncentracích nižších než $200\text{ }\mu\text{mol/l}$ nemá výrazný vliv ani na viabilitu ani na proliferaci neuroblastomových buněk, naopak koncentrace nad tuto hodnotu již zmíněné parametry snižují. Dochází tedy k postupné inhibici proliferace a zastavení buněčného růstu. Pro srovnání byl zkoumán vliv UCB a heminu. Ze získaných dat vyplývá, že UCB o koncentraci $10\text{ }\mu\text{mol/l}$ zkoumané buněčné parametry příliš neovlivňuje, ale koncentrace UCB $50\text{ }\mu\text{mol/l}$ již částečně inhibuje viabilitu i proliferaci. Hemin o koncentraci $10\text{ }\mu\text{mol/l}$ neměl na studované parametry vliv. Výsledky testů vlivu BOXů na proliferaci a viabilitu buněk jsou velice překvapivé, hlavně při srovnání s koncentračním ovlivněním buněk bilirubinem. Z výsledků vyplývá, že BOXy jsou pro buňky méně škodlivé než samotný bilirubin.

Předkládaná diplomová práce prezentuje několik možných postupů přípravy oxidačních produktů bilirubinu, díky kterým bylo možno zkoumat jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a biologické účinky, jejichž závěry jsou také součástí této práce. Dílčí výsledky získané během provádění všech experimentů budou nápomocné při dalším zkoumání této problematiky. Oxidační produkty bilirubinu by mohly být novými markery oxidačního stresu, a proto je velmi důležité pokračovat ve studiu jejich biologických účinků. Počítá se s provedením dalších *in vitro* experimentů a po nashromáždění všech potřebných dat *in vivo*.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Vítek, L., ed. *Bilirubin a Interní Choroby*. 2009, Grada Publishing, a.s.: Praha.
- [2] Stocker, R.; Yamamoto, Y.; Mcdonagh, A. F.; Glazer, A. N.; Ames, B. N.: *Science*. 235, 1043 (1987).
- [3] Bowry, V. W.; Mohr, D.; Cleary, J.; Stocker, R.: *J Biol Chem*. 270, 5756 (1995).
- [4] Loftspring, M. C.; Wurster, W. L.; Pyne-Geithman, G. J.; Clark, J. F.: *J Neurochem*. 102, 1990 (2007).
- [5] Kranc, K. R.; Pyne, G. J.; Tao, L.; Claridge, T. D.; Harris, D. A.; Cadoux-Hudson, T. A.; Turnbull, J. J.; Schofield, C. J.; Clark, J. F.: *Eur J Biochem*. 267, 7094 (2000).
- [6] Clark, J. F.; Reilly, M.; Sharp, F. R.: *J Cereb Blood Flow Metab*. 22, 472 (2002).
- [7] Clark, J. F.; Pyne-Geithman, G.: *Pathophysiology*. 12, 35 (2005).
- [8] Lyons, M. A.; Shukla, R.; Zhang, K.; Pyne, G. J.; Singh, M.; Biehle, S. J.; Clark, J. F.: *J Neurosurg*. 100, 505 (2004).
- [9] Tsukahara, H.: *Curr Med Chem*. 14, 339 (2007).
- [10] Davies, K. J.: *J Biol Chem*. 262, 9895 (1987).
- [11] Racek, J.: *Chemické listy*. 93, 774 (1998).
- [12] Droge, W.: *Physiol Rev*. 82, 47 (2002).
- [13] Ratnam, D. V.; Ankola, D. D.; Bhardwaj, V.; Sahana, D. K.; Kumar, M. N.: *J Control Release*. 113, 189 (2006).
- [14] Fridovich, I.: *Science*. 201, 875 (1978).
- [15] Grant, C. M.; Maciver, F. H.; Dawes, I. W.: *Curr Genet*. 29, 511 (1996).
- [16] Imlay, J. A.; Linn, S.: *Science*. 240, 1302 (1988).
- [17] Meister, A.; Anderson, M. E.: *Annu Rev Biochem*. 52, 711 (1983).
- [18] Štípek, S., ed. *Antioxidanty a Volné Radikály Ve Zdraví a Nemoci*. Avicenum ed. 2000, Grada Publishing: Praha.
- [19] Holmgren, A.: *Annu Rev Biochem*. 54, 237 (1985).
- [20] Saxena, A. K.; Srivastava, P.; Kale, R. K.; Baquer, N. Z.: *Biochem Pharmacol*. 45, 539 (1993).

- [21] Wollman, E. E.; D'auriol, L.; Rimsky, L.; Shaw, A.; Jacquot, J. P.; Wingfield, P.; Graber, P.; Dessarps, F.; Robin, P.; Galibert, F.; Et Al.: *J Biol Chem.* 263, 15506 (1988).
- [22] Swanson, S.; Gilroy, S.: *Physiol Plant.* 138, 384 (2010).
- [23] Foyer, C. H.; Noctor, G.: *The Plant cell.* 17, 1866 (2005).
- [24] Ignarro, L. J.; Buga, G. M.; Wood, K. S.; Byrns, R. E.; Chaudhuri, G.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 84, 9265 (1987).
- [25] Mcandrew, J.; Patel, R. P.; Jo, H.; Cornwell, T.; Lincoln, T.; Moellering, D.; White, C. R.; Matalon, S.; Darley-Usmar, V.: *Semin Perinatol.* 21, 351 (1997).
- [26] Rubbo, H.; Darley-Usmar, V.; Freeman, B. A.: *Chem Res Toxicol.* 9, 809 (1996).
- [27] Patel, R. P.; Mcandrew, J.; Sellak, H.; White, C. R.; Jo, H.; Freeman, B. A.; Darley-Usmar, V. M.: *Biochim Biophys Acta.* 1411, 385 (1999).
- [28] Beckman, J. S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshall, P. A.; Freeman, B. A.: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 1620 (1990).
- [29] Karoui, H.; Hogg, N.; Frejaville, C.; Tordo, P.; Kalyanaraman, B.: *J Biol Chem.* 271, 6000 (1996).
- [30] Quijano, C.; Alvarez, B.; Gatti, R. M.; Augusto, O.; Radi, R.: *Biochem J.* 322 (Pt 1), 167 (1997).
- [31] Koolman Jan, R. K. H., *Barevný Atlas Biochemie.* 4. ed. 2012, Praha: Grada Publishing.
- [32] Abdel-Wahab, M. H.; Abd-Allah, A. R.: *Pharmacol Res.* 41, 533 (2000).
- [33] Asayama, K.; Hayashibe, H.; Dobashi, K.; Niitsu, T.; Miyao, A.; Kato, K.: *Diabetes Res.* 12, 85 (1989).
- [34] Chow, C. K.: *Free Radic Biol Med.* 11, 215 (1991).
- [35] Laight, D. W.; Carrier, M. J.; Anggard, E. E.: *Cardiovasc Res.* 47, 457 (2000).
- [36] Rodgers, P. A.; Stevenson, D. K.: *Clin Perinatol.* 17, 275 (1990).
- [37] Vitek L., S. L., Branný P., Ruml T.: *Chem Listy.* 97, 24 (2003).
- [38] Tosaki, A.; Das, D. K.: *Mol Cell Biochem.* 232, 149 (2002).
- [39] Sedlak, T. W.; Snyder, S. H.: *Pediatrics.* 113, 1776 (2004).
- [40] Maines, M. D.: *Antioxid Redox Signal.* 7, 1761 (2005).

- [41] Saxena, S.; Shukla, D.; Khan, Y. A.; Singh, M.; Bansal, A.; Sairam, M.; Jain, S. K.: *Acta Physiol (Oxf)*. 200, 249 (2010).
- [42] Kikuchi, G.; Yoshida, T.; Noguchi, M.: *Biochem Biophys Res Commun*. 338, 558 (2005).
- [43] Morse, D.; Choi, A. M.: *Am J Respir Cell Mol Biol*. 27, 8 (2002).
- [44] Furchgott, R. F.; Jothianandan, D.: *Blood Vessels*. 28, 52 (1991).
- [45] Brune, B.; Ullrich, V.: *Mol Pharmacol*. 32, 497 (1987).
- [46] Morita, T.; Kourembanas, S.: *J Clin Invest*. 96, 2676 (1995).
- [47] Ishizaka, N.; De Leon, H.; Laursen, J. B.; Fukui, T.; Wilcox, J. N.; De Keulenaer, G.; Griendling, K. K.; Alexander, R. W.: *Circulation*. 96, 1923 (1997).
- [48] Yang, L.; Quan, S.; Nasjletti, A.; Laniado-Schwartzman, M.; Abraham, N. G.: *Hypertension*. 43, 1221 (2004).
- [49] Song, R.; Mahidhara, R. S.; Zhou, Z.; Hoffman, R. A.; Seol, D. W.; Flavell, R. A.; Billiar, T. R.; Otterbein, L. E.; Choi, A. M.: *J Immunol*. 172, 1220 (2004).
- [50] Stanford, S. J.; Walters, M. J.; Hislop, A. A.; Haworth, S. G.; Evans, T. W.; Mann, B. E.; Motterlini, R.; Mitchell, J. A.: *Eur J Pharmacol*. 473, 135 (2003).
- [51] Song, R.; Mahidhara, R. S.; Liu, F.; Ning, W.; Otterbein, L. E.; Choi, A. M.: *Am J Respir Cell Mol Biol*. 27, 603 (2002).
- [52] Amersi, F.; Shen, X. D.; Anselmo, D.; Melinek, J.; Iyer, S.; Southard, D. J.; Katori, M.; Volk, H. D.; Busuttil, R. W.; Buelow, R.; Kupiec-Weglinski, J. W.: *Hepatology*. 35, 815 (2002).
- [53] Brouard, S.; Otterbein, L. E.; Anrather, J.; Tobiasch, E.; Bach, F. H.; Choi, A. M.; Soares, M. P.: *J Exp Med*. 192, 1015 (2000).
- [54] Soares, M. P.; Usheva, A.; Brouard, S.; Berberat, P. O.; Gunther, L.; Tobiasch, E.; Bach, F. H.: *Antioxid Redox Signal*. 4, 321 (2002).
- [55] Liu, Y.; Christou, H.; Morita, T.; Laughner, E.; Semenza, G. L.; Kourembanas, S.: *J Biol Chem*. 273, 15257 (1998).
- [56] Morse, D.; Pischke, S. E.; Zhou, Z.; Davis, R. J.; Flavell, R. A.; Loop, T.; Otterbein, S. L.; Otterbein, L. E.; Choi, A. M.: *J Biol Chem*. 278, 36993 (2003).
- [57] Chauveau, C.; Bouchet, D.; Roussel, J. C.; Mathieu, P.; Braudeau, C.; Renaudin, K.; Tesson, L.; Soulillou, J. P.; Iyer, S.; Buelow, R.; Anegon, I.: *Am J Transplant*. 2, 581 (2002).

- [58] Baranano, D. E.; Rao, M.; Ferris, C. D.; Snyder, S. H.: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 16093 (2002).
- [59] Maines, M. D.: *Physiology (Bethesda)*. 20, 382 (2005).
- [60] Kravets, A.; Hu, Z.; Miralem, T.; Torno, M. D.; Maines, M. D.: *J Biol Chem*. 279, 19916 (2004).
- [61] Liu, Y.; Liu, J.; Tetzlaff, W.; Paty, D. W.; Cynader, M. S.: *Free Radic Biol Med*. 40, 960 (2006).
- [62] Colpaert, E. E.; Timmermans, J. P.; Lefebvre, R. A.: *Free Radic Biol Med*. 32, 630 (2002).
- [63] Maines, M. D.; Ewing, J. F.; Huang, T. J.; Panahian, N.: *J Pharmacol Exp Ther*. 296, 1091 (2001).
- [64] Magnusson, S.; Ekstrom, T. J.; Elmer, E.; Kanje, M.; Ny, L.; Alm, P.: *Neuroscience*. 95, 821 (2000).
- [65] K., K. *Human Biliverdin Reductase Alpha*. 2006; Available from: <http://www.thesgc.org/structures/details?pdbid=2h63>.
- [66] Falk, H., *Bile Pigments and Jaundice. Molecular, Metabolic and Medical Aspects*. 1986, New York.
- [67] Bissell D. M., *Bile Pigments and Jaundice. Molecular, Metabolic and Medical Aspects*. 1986, New York.
- [68] Stocker, R.: *Antioxid Redox Signal*. 6, 841 (2004).
- [69] Jansen, T.; Hortmann, M.; Oelze, M.; Opitz, B.; Steven, S.; Schell, R.; Knorr, M.; Karbach, S.; Schuhmacher, S.; Wenzel, P.; Munzel, T.; Daiber, A.: *J Mol Cell Cardiol*. 49, 186 (2010).
- [70] Vitek, L.; Jirsa, M.; Brodanova, M.; Kalab, M.; Marecek, Z.; Danzig, V.; Novotny, L.; Kotal, P.: *Atherosclerosis*. 160, 449 (2002).
- [71] Vitek, L.; Kraslova, I.; Muchova, L.; Novotny, L.; Yamaguchi, T.: *J Gastroenterol Hepatol*. 22, 841 (2007).
- [72] Marilena, G.: *Biochem Mol Med*. 61, 136 (1997).
- [73] Pascolo, L.; Ferneti, C.; Garcia-Mediavilla, M. V.; Ostrow, J. D.; Tiribelli, C.: *FEBS Lett*. 495, 94 (2001).
- [74] Puga, A.; Marlowe, J.; Barnes, S.; Chang, C. Y.; Maier, A.; Tan, Z.; Kerzee, J. K.; Chang, X.; Strobeck, M.; Knudsen, E. S.: *Toxicology*. 181-182, 171 (2002).
- [75] Halliwell, B.; Zhao, K.; Whiteman, M.: *Free Radic Res*. 31, 651 (1999).

- [76] Toyokuni, S.: *Pathol Int.* 49, 91 (1999).
- [77] Kharitonov, S. A.; Barnes, P. J.: *Biomarkers.* 7, 1 (2002).
- [78] Noiri, E.; Tsukahara, H.: *J Investig Med.* 53, 167 (2005).
- [79] Jakus, V.; Rietbrock, N.: *Physiol Res.* 53, 131 (2004).
- [80] Uchida, K.: *Trends Cardiovasc Med.* 9, 109 (1999).
- [81] Nagano, T.; Yoshimura, T.: *Chem Rev.* 102, 1235 (2002).
- [82] Hokamaki, J.; Kawano, H.; Yoshimura, M.; Soejima, H.; Miyamoto, S.; Kajiwara, I.; Kojima, S.; Sakamoto, T.; Sugiyama, S.; Hirai, N.; Shimomura, H.; Nagayoshi, Y.; Tsujita, K.; Shioji, I.; Sasaki, S.; Ogawa, H.: *J Am Coll Cardiol.* 43, 1880 (2004).
- [83] Otani, K.; Shimizu, S.; Chijiwa, K.; Yamaguchi, K.; Kuroki, S.; Tanaka, M.: *J Surg Res.* 96, 44 (2001).
- [84] Yamaguchi, T.; Shioji, I.; Sugimoto, A.; Yamaoka, M.: *Biochem Biophys Res Commun.* 293, 517 (2002).
- [85] Miyashita, T.; Yamaguchi, T.; Motoyama, K.; Unno, K.; Nakano, Y.; Shimoi, K.: *Biochem Biophys Res Commun.* 349, 775 (2006).
- [86] Blowey, D. L.: *J Clin Hypertens (Greenwich).* 14, 383 (2012).
- [87] Jun, T.; Ke-Yan, F.; Catalano, M.: *J Hum Hypertens.* 10, 305 (1996).
- [88] McIntyre, M.; Bohr, D. F.; Dominiczak, A. F.: *Hypertension.* 34, 539 (1999).
- [89] Taddei, S.; Virdis, A.; Ghiadoni, L.; Salvetti, A.: *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 7, 203 (1998).
- [90] Forte, P.; Copland, M.; Smith, L. M.; Milne, E.; Sutherland, J.; Benjamin, N.: *Lancet.* 349, 837 (1997).
- [91] Rubanyi, G. M.; Vanhoutte, P. M.: *Am J Physiol.* 250, H822 (1986).
- [92] Pluta, R. M.: *Pharmacol Ther.* 105, 23 (2005).
- [93] Buckell, M.: *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 27, 198 (1964).
- [94] J., K. R., Klaus-Heinrich, *Barevný Atlas Biochemie, Překlad 4. Vydání.* 2012, Praha: Grada Publishing.
- [95] Masopust, J., *Klinická Biochemie.* Vol. 1. vydání. 1998, Praha: Karolinum.
- [96] Weisburger, J. H.; Williams, G. M.: *Science.* 214, 401 (1981).

- [97] Kolaja, K. L.; Stevenson, D. E.; Walborg, E. F., Jr.;Klaunig, J. E.: *Carcinogenesis*. 17, 1243 (1996).
- [98] Pitot, H. C.; Goldsworthy, T.;Moran, S.: *J Supramol Struct Cell Biochem*. 17, 133 (1981).
- [99] Schulte-Hermann, R.; Grasl-Kraupp, B.;Bursch, W.: *Int Arch Allergy Immunol*. 105, 363 (1994).
- [100] Butterworth, B. E.: *Mutat Res*. 239, 117 (1990).
- [101] Ames, B. N.;Gold, L. S.: *Science*. 249, 970 (1990).
- [102] Guyton, K. Z.;Kensler, T. W.: *Br Med Bull*. 49, 523 (1993).
- [103] Edelman, D.; Olsen, M. K.; Dudley, T. K.; Harris, A. C.;Oddone, E. Z.: *Diabetes Care*. 26, 367 (2003).
- [104] Bonnefont-Rousselot, D.: *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 5, 561 (2002).
- [105] Brownlee, M.: *Nature*. 414, 813 (2001).
- [106] Spitaler, M. M.;Graier, W. F.: *Diabetologia*. 45, 476 (2002).
- [107] West, I. C.: *Diabet Med*. 17, 171 (2000).
- [108] Amos, A. F.; Mccarty, D. J.;Zimmet, P.: *Diabet Med*. 14 Suppl 5, S1 (1997).
- [109] Anon, J. B.: *Ear Nose Throat J*. 72, 329 (1993).
- [110] Omata, N.; Tsukahara, H.; Ito, S.; Ohshima, Y.; Yasutomi, M.; Yamada, A.; Jiang, M.; Hiraoka, M.; Nambu, M.; Deguchi, Y.;Mayumi, M.: *Life Sci*. 69, 223 (2001).
- [111] Zeitz, H. J.;Jarmoszuk, I.: *Compr Ther*. 11, 21 (1985).
- [112] Corradi, M.; Folesani, G.; Andreoli, R.; Manini, P.; Bodini, A.; Piacentini, G.; Carraro, S.; Zanconato, S.;Baraldi, E.: *Am J Respir Crit Care Med*. 167, 395 (2003).
- [113] Letarte, P. B.; Lieberman, K.; Nagatani, K.; Haworth, R. A.; Odell, G. B.;Duff, T. A.: *J Neurosurg*. 79, 252 (1993).
- [114] Pyne-Geithman, G. J.; Nair, S. G.; Caudell, D. N.;Clark, J. F.: *Front Biosci*. 13, 1526 (2008).
- [115] Mcdonagh, A. F.;Assisi, F.: *Biochem J*. 129, 797 (1972).
- [116] Bonnefont-Rousselot, D.; Collin, F.; Jore, D.;Gardes-Albert, M.: *J Pineal Res*. 50, 328 (2011).

- [117] Calligaris, R.; Bellarosa, C.; Foti, R.; Roncaglia, P.; Giraudi, P.; Krnac, H.; Tiribelli, C.; Gustincich, S.: *BMC Genomics*. 10, 543 (2009).

PODĚKOVÁNÍ

Poděkovat bych chtěl především panu doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc., prof. MUDr. Liborovi Vítkovi, PhD., MBA a Mgr. Janě Vaníkové za poskytnuté informace k experimentální části práce, proniknutí do dané problematiky a odborné rady při psaní diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat celému Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze za poskytnutí odborného pracoviště pro vypracování mé diplomové práce. Chtěl bych také poděkovat své přítelkyni za podporu při psaní této práce.